

Aus dem  
Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung  
Universität des Saarlandes  
Zentrum für Experimentelle Orthopädie  
Universitätsklinikum des Saarlandes  
Direktor: Prof. Dr. med. Henning Madry

**Genetische Manipulation von mesenchymalen Stammzellen mittels  
rekombinanter adeno-assoziiertes viraler (rAAV) Vektoren für  
verbesserte Knorpelreparatur**

KUMULATIVE PROMOTION

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von: Janina Sarah Frisch  
geboren am: 08.07.1988 in Zweibrücken

Erstberichterstatte: Prof. Dr. Gerald Thiel (Medizinische Biochemie und Molekularbiologie)  
Zweitberichterstatte: Prof. Dr. Magali Madry, geb. Cucchiarini (Lehrstuhl für Experimentelle  
Orthopädie und Arthroseforschung)

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>2</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>EINGESCHLOSSENE ORIGINALARBEITEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>17</b>
1.1. Gelenkknorpel .....	17
<i>Aufbau und Struktur.....</i>	17
<i>Knorpelverletzungen.....</i>	20
<i>Therapieoptionen.....</i>	23
1.2. Stammzellen in der Knorpelreparatur.....	23
<i>Allgemeines .....</i>	23
<i>Mesenchymale Stammzellen (MSZ) .....</i>	24
<i>Mesenchymale Stammzellen in der Skelettentwicklung .....</i>	26
<i>Wichtige Parameter bei der Anwendung zur Knorpelreparatur.....</i>	29
1.3. Gentherapie.....	30
<i>Allgemeines .....</i>	30
<i>Gentherapie in der Klinik .....</i>	31
<i>Gentransfer in der Knorpelreparatur .....</i>	32
<i>Adeno-assoziierte Viren .....</i>	33
<i>Insulinartiger Wachstumsfaktor I.....</i>	41
<i>Transformierender Wachstumsfaktor <math>\beta</math>.....</i>	44
1.4. Hypothesen und Studiendesign .....	47

<b>2. DARSTELLUNG DER EINZELNEN PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>49</b>
<i>I. rAAV-vermittelte Überexpression von IGF-I in humanen, aus Knochenmark isolierten MSZ.....</i>	<i>49</i>
<i>II. rAAV-vermittelte Überexpression von TGF-<math>\beta</math> in humanen, aus Knochenmark isolierten MSZ ...</i>	<i>52</i>
<i>III. rAAV-vermittelte Überexpression von IGF-I in humanen Knochenmarkaspiraten.....</i>	<i>55</i>
<i>IV. rAAV-vermittelte Überexpression von TGF-<math>\beta</math> in humanen Knochenmarkaspiraten .....</i>	<i>58</i>
<b>3. DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<i>Überprüfung der Hypothese 1 mit allgemeiner Interpretation .....</i>	<i>61</i>
<i>Überprüfung der Hypothese 2 mit allgemeiner Interpretation .....</i>	<i>62</i>
<i>Diskussion des internen Interpretationsziels .....</i>	<i>64</i>
<i>Ausblick .....</i>	<i>67</i>
<b>4. REFERENZEN .....</b>	<b>71</b>
<b>5. ANHANG .....</b>	<b>87</b>
<i>Originalarbeiten .....</i>	<i>87</i>
<i>Danksagung .....</i>	<i>136</i>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> <b>A.</b> Schematische Darstellung und <b>B.</b> Safranin-O/Fast Green Färbung des morphologischen Aufbaus von hyalinem Gelenkknorpel. ....	18
<b>Abb. 2:</b> Proteoglykan-Aggregat im Knorpelgewebe. ....	19
<b>Abb. 3:</b> Aufbau des Proteoglykans Aggrekan. ....	20
<b>Abb. 4:</b> <b>A.</b> Arthroskopische Aufnahmen und <b>B.</b> Safranin-O/Fast Green Färbung eines lokal begrenzten Knorpeldefekts (links) und Arthrose (rechts) des Kniegelenks. ....	21
<b>Abb. 5:</b> Klassifizierung von Knorpeldefekten. ....	22
<b>Abb. 6:</b> Stichprobenartige FACS-Analysen zur Überprüfung ausgewählter Charakterisierungsmerkmale von aus Knochenmark isolierten MSZ. ....	26
<b>Abb. 7:</b> Prozess der endochondralen Ossifikation. ....	27
<b>Abb. 8:</b> Aufbau der Wachstumsfuge mit Einteilung der Zonen und beteiligten Zelltypen. ....	29
<b>Abb. 9:</b> <b>A.</b> Schematische Darstellung eines AAV-Partikels; <b>B.</b> Fluorochrom(Cy3)-markierte AAV-2 Partikel in mesenchymalen Stammzellen. ....	33
<b>Abb. 10:</b> Wildtyp AAV-2 Genom mit vergrößerter Darstellung der 5'ITR. ....	34
<b>Abb. 11:</b> Wirtszellinfektion von AAV. ....	36
<b>Abb. 12:</b> Rekombinantes AAV-2 Genom. ....	38
<b>Abb. 13:</b> rAAV Herstellung. ....	39
<b>Abb. 14:</b> Schematischer Aufbau des Grundplasmids (pSSV9) sowie der beiden Basisplasmide zur Transfektion (AAV und Ad8). ....	40
<b>Abb. 15:</b> Hauptachsen des IGF-I Signalwegs. ....	43
<b>Abb. 16:</b> Hauptachsen des TGF- $\beta$ Signalwegs mit Darstellung der beiden wichtigsten Teilachsen. ....	45
<b>Abb. 17:</b> Studiendesign. ....	48
<b>Abb. 18:</b> Graphische Zusammenfassung der Publikation I. ....	49
<b>Abb. 19:</b> Graphische Zusammenfassung der Publikation II. ....	52
<b>Abb. 20:</b> Graphische Zusammenfassung der Publikation III. ....	55
<b>Abb. 21:</b> Graphische Zusammenfassung der Publikation IV. ....	58
<b>Abb. 22:</b> Graphische Darstellung des internen Vergleichs zwischen IGF-I und TGF- $\beta$ . ....	66
<b>Abb. 23:</b> Schrittweise Überführung der Ansätze in klinisch relevante Tiermodelle. ....	68



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
Ad5/8	Adenovirus (Serotyp 5 oder 8)
AGE	engl.: <i>Advanced Glycation End Products</i>
Akt	Proteinkinase B
Amp <sup>R</sup>	Antibiotika-Resistenz
ASZ	engl.: <i>Adipose-derived</i> MSZ (Stammzelle aus Fettgewebe)
Bcl-xl	engl.: <i>B-cell Lymphoma Extra Large</i>
BM-MSZ	engl.: <i>Bone Marrow</i> MSZ (Stammzelle aus Knochenmark)
BMP	engl.: <i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Knochenmorphogenetisches Protein)
bp	Basenpaare
<i>cap</i>	AAV-Gen für Capsidbildung
CD	engl.: <i>Cluster of Differentiation</i>
CDMP	engl.: <i>Carilage-derived Morphogenetic Protein</i>
CMV-IE	engl.: Cytomegalievirus <i>Immediate-Early</i>
COMP	engl.: <i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
CS	Chondroitinsulfat
CTGF	engl.: <i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DNA	engl.: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	Escherischia Coli
ERK	engl.: <i>Extracellular Signal-related Kinase</i>
ESZ	Embryonale Stammzelle
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	engl.: <i>Fluorescent-activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FDA	engl.: <i>Food and Drug Administration</i>
FGF	engl.: <i>Fibroblast Growth Factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
G	Globuläre Region
GAG	Glykosaminoglykane
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
GOI	engl.: <i>Gene of Interest</i>

Grb	engl.: <i>Growth Factor Receptor-bound Protein</i>
HCC	engl.: <i>Hepatocellular Carcinoma</i> (Leberzellkarzinom)
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan Rezeptor
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
hTERT	engl.: <i>Human Telomerase</i>
IGD	Interglobuläre Domäne
IGF	engl.: <i>Insulin-like Growth Factor</i> (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IGF-IR	IGF-I Rezeptor
IHH	engl.: <i>Indian Hedgehog</i>
iPSZ	Induzierte Pluripotente Stammzelle
ITR	engl.: <i>Inverted Terminal Repeat</i>
JNK	engl.: <i>c-Jun-NH2-terminal Kinase</i>
kb	Kilobasen
KS	Keratansulfat
<i>LacZ</i>	$\beta$ -Galactosidase-Gen
MAPK	engl.: <i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCS	engl.: <i>Multiple Cloning Site</i> (variable Klonierungsstelle)
MEK	engl.: <i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MOI	engl.: <i>Multiplicity of Infection</i> (Infektionsmultiplizität)
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
mTOR	engl.: <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N-Cad	N-Cadherin
N-CAM	engl.: <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> (neurales Zelladhäsionsmolekül)
nm	Nanometer
OA	engl.: <i>Osteoarthritis</i> (Arthrose)
OARSI	engl.: <i>Osteoarthritis Research Society International</i>
Ori	Replikationsursprung
PCR	engl.: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
polyA	Polyadenylierungssignal
PPAR	engl.: <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor</i>

PP-MSZ	Stammzelle aus Perichondrium/Periosteum
pSSV	AAV-2 genomischer Klon nach Samulski
PTHrP	engl.: <i>Parathyroid Hormone-related Protein</i> (Parathormon-ähnliches Peptid)
rAAV Vektoren	Rekombinante Adeno-assoziierte Virale Vektoren
<i>raf</i>	Proto-Onkogen
<i>ras</i>	Proto-Onkogen
RBE	engl.: <i>Rep Binding Element</i>
<i>rep</i>	AAV-Gen für Replikation
RUNX	engl.: <i>Runt-related Transcription Factor</i>
SDSC	engl.: <i>Synovial-derived Stem Cell</i> (Stammzelle aus Synovialmembran)
siRNA	engl.: <i>small interfering Ribonucleic Acid</i> ( <i>small interfering</i> Ribonukleinsäure)
Smad	engl.: <i>Sma and Mad Related Family</i>
SOS	GTP-Austauschfaktor
SOX9	engl.: <i>SRY [Sex-determining Region Y]-related HMG [High-Mobility Group] Box 9</i>
SV40-pA	Polyadenylierung des Simian Virus 40
TGF- $\beta$	engl.: <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
TNF	Tumornekrosefaktor
trs	engl.: <i>Terminal Resolution Site</i>
VEGF	engl.: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	engl.: <i>Drosophila Segment Polarity Gene wingless and Vertebrate Homolog</i> integrated int-1
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ZNF	engl.: <i>Zinc-Finger Protein</i>

## **Eingeschlossene Originalarbeiten**

In die vorliegende kumulative Dissertation sind folgende Veröffentlichungen (I – IV) eingeschlossen, die in Fachzeitschriften im *peer reviewed* Verfahren publiziert wurden. Der Anteil und die Tätigkeit der Mitautoren an den einzelnen Publikationen werden nachfolgend im Detail aufgelistet. Alle Mitautoren sind mit einer Veröffentlichung der Originalarbeiten im Rahmen dieser kumulativen Dissertation einverstanden und bestätigten ihr Einverständnis sowie ihren Tätigkeitsanteil mit ihrer Unterschrift. Die Liste mit allen Unterschriften wurde mit Antrag auf Zulassung zum Promotionsverfahren im Dekanat eingereicht.

## Publikation I.

**Frisch J**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiarini M. Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. 2014 Aug 27;5(4):103.

Mitautoren	Beitrag
<b>Frisch, Janina</b>	Experimentelle Arbeiten, Datenerhebung & -Analyse, statistische Auswertung, Überarbeitung des Manuskripts
<b>Venkatesan, Jagadeesh Kumar</b> <b>Rey-Rico, Ana</b> <b>Schmitt, Gertrud</b>	Technische Hilfestellung bei der Datenerhebung und -Analyse
<b>Madry, Henning</b>	Hilfestellung bei der Datenanalyse und – Interpretation
<b>Cucchiarini, Magali</b> <b>(verh. Madry)</b>	Konzeption der Studie, Hilfestellung bei der Datenanalyse und -Interpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

**Alle Autoren haben eine Kopie dieses Dokuments unterzeichnet.**

**Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine *Open Access* Publikation des Verlegers BioMed Central. Für einen Einschluss in die vorliegende Promotionsarbeit inklusive aller Vervielfältigungen (in gedruckter und elektronischer Form) ist demnach keine gesonderte Erlaubnis erforderlich. Bestätigung vom Verlag erhalten am 27.04.2016.**

## Publikation II.

**Frisch J**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiarini M. Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor- $\beta$  via recombinant adeno-associated viral vectors. Hum Gene Ther. 2014 Dec;25(12):1050-60.

Mitautoren	Beitrag
<b>Frisch, Janina</b>	Experimentelle Arbeiten, Datenerhebung & -Analyse, statistische Auswertung, Überarbeitung des Manuskripts
<b>Venkatesan, Jagadeesh Kumar</b> <b>Rey-Rico, Ana</b> <b>Schmitt, Gertrud</b>	Technische Hilfestellung bei der Datenerhebung und -Analyse
<b>Madry, Henning</b>	Hilfestellung bei der Datenanalyse und – Interpretation
<b>Cucchiarini, Magali</b> <b>(verh. Madry)</b>	Konzeption der Studie, Hilfestellung bei der Datenanalyse und -Interpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

**Alle Autoren haben eine Kopie dieses Dokuments unterzeichnet.**

**Die Rechte zur Vervielfältigung dieser Publikation liegen ausschließlich beim Verleger (*Mary Ann Liebert, Inc.*). Für einen Einschluss in die vorliegende Promotionsarbeit inklusiver aller Vervielfältigungen (in gedruckter und elektronischer Form) wurde eine Erlaubnis erteilt (Copyright Clearance Center Bestätigung am 24.05.2016, License ID 3875370842234).**

### **Publikation III.**

**Frisch J**, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiariini M. Chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates upon rAAV-mediated gene transfer and overexpression of the insulin-like growth factor I. Tissue Eng Part A. 2015 Sep;21(17-18):2460-71.

<b>Mitautoren</b>	<b>Beitrag</b>
<b>Frisch, Janina</b>	Mitwirkung bei der Konzeption der Studie, Experimentelle Arbeiten, Datenerhebung, Datenanalyse, statistische Auswertung, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts
<b>Rey-Rico, Ana</b> <b>Venkatesan, Jagadeesh Kumar</b> <b>Schmitt, Gertrud</b>	Technische Hilfestellung bei der Datenerhebung und -Analyse
<b>Madry, Henning</b>	Hilfestellung bei der Datenanalyse und – Interpretation
<b>Cucchiariini, Magali</b> <b>(verh. Madry)</b>	Konzeption der Studie, Hilfestellung bei der Datenanalyse und -Interpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

**Alle Autoren haben eine Kopie dieses Dokuments unterzeichnet.**

**Die Rechte zur Vervielfältigung dieser Publikation liegen ausschließlich beim Verleger (Mary Ann Liebert, Inc.). Für einen Einschluss in die vorliegende Promotionsarbeit inklusiver aller Vervielfältigungen (in gedruckter und elektronischer Form) wurde eine Erlaubnis erteilt (Copyright Clearance Center Bestätigung am 24.05.2016, License ID 3875370839806).**

**Publikation IV.**

**Frisch J**, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiarini M. TGF- $\beta$  gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. J Cell Mol Med. 2016 Mar;20(3):430-40.

<b>Mitautoren</b>	<b>Beitrag</b>
<b>Frisch, Janina</b>	Mitwirkung bei der Konzeption der Studie, Experimentelle Arbeiten, Datenerhebung, Datenanalyse, statistische Auswertung, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts
<b>Rey-Rico, Ana</b> <b>Venkatesan, Jagadeesh Kumar</b> <b>Schmitt, Gertrud</b>	Technische Hilfestellung bei der Datenerhebung und -Analyse
<b>Madry, Henning</b>	Hilfestellung bei der Datenanalyse und – Interpretation
<b>Cucchiarini, Magali</b> <b>(verh. Madry)</b>	Konzeption der Studie, Hilfestellung bei der Datenanalyse und -Interpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

**Alle Autoren haben eine Kopie dieses Dokuments unterzeichnet.**

**Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine *Open Access* Publikation des Verlegers *John Wiley & Sons Ltd.* Für einen Einschluss in die vorliegende Promotionsarbeit inklusive aller Vervielfältigungen (in gedruckter und elektronischer Form) ist demnach keine gesonderte Erlaubnis erforderlich. Bestätigung des Verlags erhalten am **06.05.2016.****



**Weitere Publikationen der Autorin, die nicht Bestandteil dieser Dissertation sind:**

Erstautorenschaft promotionsrelevanter Themen:

- **J. Frisch**, P. Orth, A. Rey-Rico, J.K. Venkatesan, G. Schmitt, D. Kohn, H. Madry, M. Cucchiari. Peripheral blood aspirates overexpressing IGF-I via rAAV gene transfer demonstrate stimulated chondrogenic activities. Manuscript in preparation.
- **J. Frisch** and M. Cucchiari. Gene- and stem cell-based approaches to regulate hypertrophic differentiation in articular cartilage disorders. Stem Cells Dev. (2016)
- **J. Frisch**, P. Orth, J.K. Venkatesan, A. Rey-Rico, G. Schmitt, D. Kohn, H. Madry, M. Cucchiari. Genetic modification of human peripheral blood aspirates using rAAV vectors for articular cartilage repair with a focus on chondrogenic TGF- $\beta$  gene delivery. Submitted to Stem Cells Transl Med, in revision. (July 2016)
- **J. Frisch**, J.K. Venkatesan, A. Rey-Rico, A.M. Zawada, G. Schmitt, H. Madry, M. Cucchiari. Effects of rAAV-mediated FGF-2 gene transfer and overexpression upon the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates. J Exp Orth, in press. (2016)
- **J. Frisch**, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry, and M. Cucchiari. rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF-beta, and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair. Gene Ther. (2015)
- **J. Frisch**, J. K. Venkatesan, A. Rey-Rico, H. Madry, and M. Cucchiari. Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. Curr Stem Cell Res Ther. (2014)

Co-Autorenschaft promotionsrelevanter Themen:

- A. Rey-Rico, **J. Frisch**, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, I. Rial-Hermida, P. Taboada, A. Concheiro, H. Madry, C. Alvarez-Lorenzo, and M. Cucchiari. PEO-PPO-PEO carriers for rAAV-mediated transduction of human articular chondrocytes in vitro and in a human osteochondral defect model. ACS Appl Mater Interfaces. (2016)
- K. Tao, A. Rey-Rico, **J. Frisch**, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry, J. Lin, and M. Cucchiari. rAAV-mediated combined gene transfer and overexpression of TGF-beta and SOX9 remodels human osteoarthritic articular cartilage. J Orthop Res. (2016)
- K. Tao, **J. Frisch**, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry, J. Lin, and M. Cucchiari. Co-overexpression of TGF-beta and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther. (2016)
- M. Cucchiari, K. Schmidt, **J. Frisch**, D. Kohn, and H. Madry. Overexpression of TGF-beta via rAAV-mediated gene transfer promotes the healing of human meniscal lesions ex vivo on explanted menisci. Am J Sports Med. (2015)

- Rey-Rico, J. K. Venkatesan, **J. Frisch**, I. Rial-Hermida, G. Schmitt, A. Concheiro, H. Madry, C. Alvarez-Lorenzo, and M. Cucchiari. PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. Acta Biomater. (2015)
- Rey-Rico, J. K. Venkatesan, **J. Frisch**, G. Schmitt, A. Monge-Marcet, P. Lopez-Chicon, A. Mata, C. Semino, H. Madry, and M. Cucchiari. Effective and durable genetic modification of human mesenchymal stem cells via controlled release of rAAV vectors from self-assembling peptide hydrogels with a maintained differentiation potency. Acta Biomater. (2015)
- Rey-Rico, **J. Frisch**, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry, and M. Cucchiari. Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. Gene Ther. (2014)

#### Sonstige:

- J. Fahrer, **J. Frisch**, G. Nagel, A. Kraus, B. Dorsam, A. D. Thomas, S. Reissig, A. Waisman, and B. Kaina. DNA repair by MGMT, but not AAG, causes a threshold in alkylation-induced colorectal carcinogenesis. Carcinogenesis. (2015)
- D. Holthoewer, K. M. Kirschbaum, **J. Frisch**, C. Hiemke, and U. Schmitt. Pharmacodynamic effects of aripiprazole and ziprasidone with respect to p-glycoprotein substrate properties. Pharmacopsychiatry. (2013)
- Weimer, H. Madry, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, **J. Frisch**, A. Wezel, J. Jung, D. Kohn, E. F. Terwilliger, S. B. Trippel, and M. Cucchiari. Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulinlike growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. Mol Med. (2012)
- Law J.K.Y., Yeung C. K., **Frisch J.**, Knapp S., Ingebr, t S., Rudd J. A., and Chan M. Cardioprotective effects of potassium channel openers on rat atria and isolated hearts under acute hypoxia. J. Phys. Pharm. Adv. (2012)

## Zusammenfassung

Hyaliner Gelenkknorpel als gewichtstragender Teil in Körpergelenken ist verantwortlich für ein reibungsloses Gleiten der knöchernen Oberflächen und ist somit für die volle Funktionsfähigkeit der Gelenke von großer Bedeutung. Verletzungen dieser klinisch relevanten Schicht, verursacht beispielsweise durch Trauma oder Arthrose, können nicht selbstständig ausheilen, da keine Blut- oder Lymphgefäße im Knorpel vorhanden sind, die reparative Zellen wie mesenchymale Stammzellen (MSZ) in die verletzten Bereiche transportieren können. Die Transplantation genetisch veränderter MSZ bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Reparaturkapazitäten des Knorpels durch Verstärkung der chondrogenen Differenzierungsprozesse. In der vorliegenden Arbeit wurden die klinisch adaptierten rekombinanten adeno-assoziierten viralen Vektoren verwendet, um in humanen, aus Knochenmark isolierten MSZ oder vollständigen Knochenmarkaspiraten eine Überexpression der chondrogenen Faktoren Insulinartiger Wachstumsfaktor I (engl.: *Insulin-like Growth Factor I* - IGF-I) und Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (engl.: *Transforming Growth Factor  $\beta$*  - TGF- $\beta$ ) zu induzieren. Sowohl in isolierten MSZ als auch im Knochenmark konnte eine langanhaltende Transgenexpression der Faktoren nachgewiesen werden, die im Vergleich zur internen Reportergenkontrolle in allen Versuchsansätzen zur Stimulation der proliferativen Eigenschaften, der chondrogenen Differenzierungsprozesse sowie der Matrixsynthese führte. Interessanterweise wurde infolge der IGF-I Überexpression sowohl in isolierten Zellen als auch im Knochenmark zusätzlich eine nachteilige Steigerung von Prozessen der Hypertrophie und terminaler Differenzierung detektiert. Im Gegensatz hierzu war TGF- $\beta$  bei Anwendung im Knochenmark sogar in der Lage, solche Vorgänge zu reduzieren, während isolierte Stammzellen weiterhin verstärkte Expression hypertropher und osteogener Marker infolge der TGF- $\beta$  Überexpression aufwiesen. Die biologische Umgebung der MSZ kann demnach für die Auswirkungen des Gentransfers eine außerordentlich wichtige und unterstützende Rolle spielen, eine detaillierte Analyse der beteiligten Signalwege muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Dennoch wurden sowohl IGF-I als auch TGF- $\beta$  als potentielle Kandidaten zur Anwendung einer Gentherapie für Knorpelverletzungen identifiziert, wobei sich TGF- $\beta$  deutlich als Faktor höherer Effizienz erwies. Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit vielversprechende Einblicke in experimentelle Grundlagen der Knorpelreparatur. Sie bietet durch den therapeutischen Ansatz eine Basis, auf der viele weiterführende Studien durchgeführt werden können, die letztlich zur Verbesserung der vorhandenen Therapieoptionen von Knorpelverletzungen beitragen können.

## **Abstract**

### **Genetic manipulation of mesenchymal stem cells via recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors for cartilage repair**

Hyaline articular cartilage is the tissue that allows for a smooth gliding and weight bearing on articulating surfaces and is of high importance for the full efficiency of joint movements. Due to its avascular nature without lymphatic drainage, cartilage has no access to reparative cells such as mesenchymal stem cells (MSCs) that are normally transported to sites of injury to develop new and healthy repair tissue. Thus, cartilage injuries as resulted from acute trauma or osteoarthritis have no ability for self-repair and progress over time. The transplantation of genetically modified bone marrow-derived isolated MSCs or whole bone marrow aspirates offers a promising approach to enhance cartilage repair via stimulation of chondrogenic differentiation processes. The present study used the clinical adapted recombinant adeno-associated viral vectors to induce an overexpression of the chondrogenic factors Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in bone marrow-derived MSCs and bone marrow aspirates. In both sample types, efficient and long-term transgene expression was detected, leading to a stimulation of the proliferative properties, chondrogenic differentiation processes and matrix synthesis in all experimental setups. Of note, IGF-I overexpression led to an additional increase in undesirable events of hypertrophy and terminal differentiation in both isolated MSCs and marrow aspirates. In contrast, TGF- $\beta$  was able to reduce such processes in bone marrow aspirates, while isolated MSCs still showed an upregulation of hypertrophic and osteogenic markers due to TGF- $\beta$  overexpression. Thus, the biological environment of MSCs can provide a remarkable and supportive impact on the outcomes of a gene transfer, showing the need of further detailed analyses of the pathways and factors involved. Nevertheless, both IGF-I and TGF- $\beta$  were shown to be potential candidates for gene therapy to treat cartilage injuries, even though TGF- $\beta$  was found to be clearly more efficient. In conclusion, the present study provides promising insights on experimental basics for cartilage repair, enabling new opportunities for continuative studies that can finally improve current therapeutic options for cartilage repair.

## 1. Einleitung

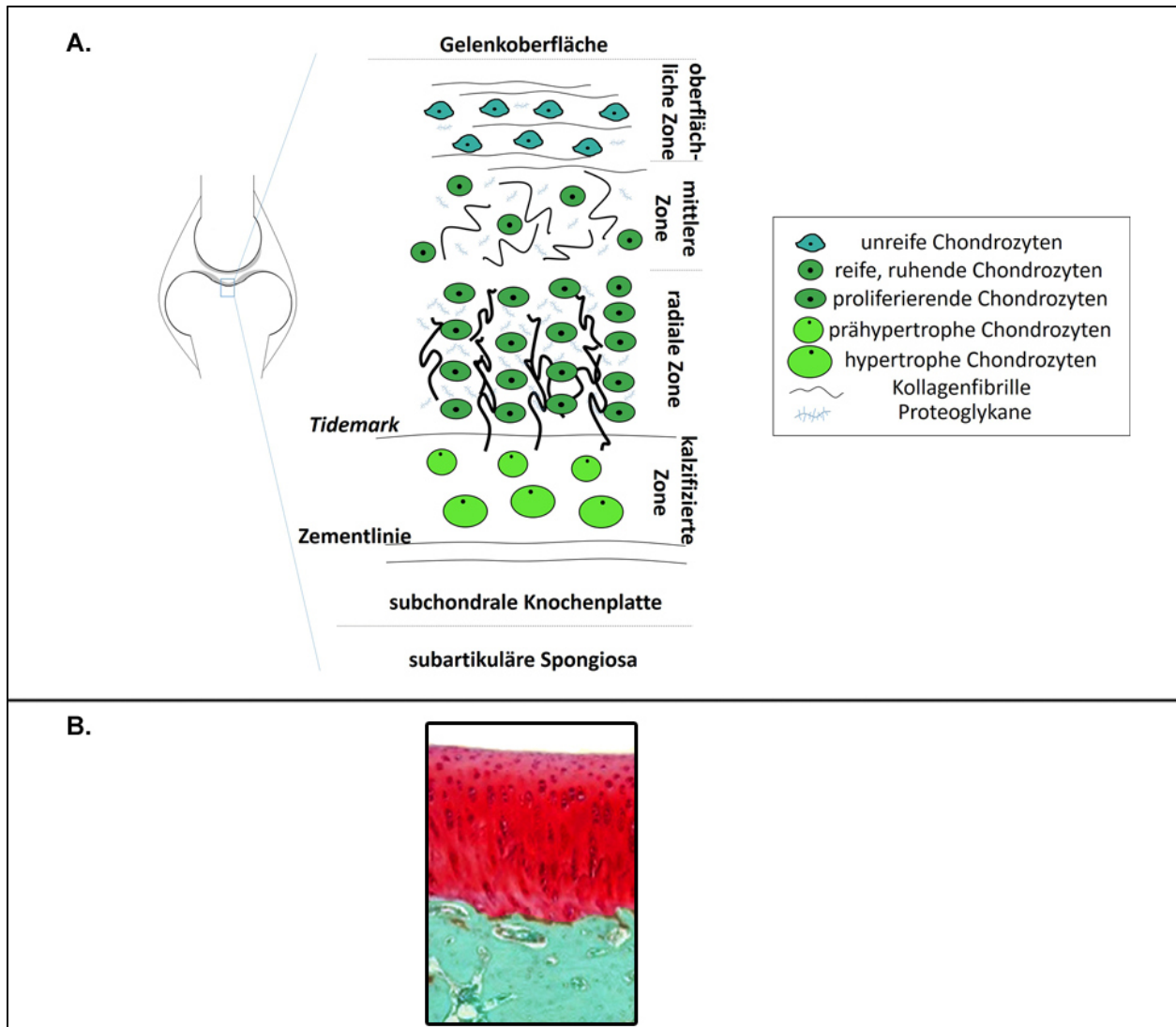
### 1.1. Gelenkknorpel

#### Aufbau und Struktur

Der hyaline Gelenkknorpel ist verantwortlich für ein reibungsloses Gleiten der beteiligten knöchernen Oberflächen und muss in der Lage sein, großen Belastungen zu widerstehen<sup>3,4</sup>. Daher ist die strukturelle Integrität des Gelenkknorpels von großer Bedeutung für die Bewegung des Gelenks<sup>3,5</sup>. Hyaliner Knorpel besteht aus einem einzigen speziellen Zelltyp, den Chondrozyten, umgeben von einem dichten Netzwerk aus Extrazellulärmatrix (EZM), welche vorwiegend aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen (hauptsächlich Typ II, aber auch Typ IX, XI, VI und XIV) aufgebaut ist<sup>6</sup>. Mit geringerem Anteil sind auch andere Makromoleküle innerhalb der EZM vertreten, wie beispielsweise (engl.) *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP), (engl.) *Link Protein*, Dekorin, Fibromodulin, Fibronectin oder Tenascin<sup>4</sup>. Ungefähr 70 bis 80% des hyalinen Knorpels bestehen aus Wasser, welches an Proteoglykane gebunden ist und entscheidend für die einzigartige mechanische Belastbarkeit des Gewebes ist<sup>7</sup>. Adulter Gelenkknorpel hat keinen Zugang zu Blut- und Lymphgefäßen oder Nervenzellen, eine Versorgung mit Nährstoffen erfolgt ausschließlich über Diffusion aus dem umliegenden Gewebe und der Gelenkflüssigkeit<sup>6</sup>.

Die morphologische Einteilung des Knorpels erfolgt in 4 Zonen: die oberflächliche, die mittlere und die radiale Zone mit anschließendem Übergang an einer klaren Trennungslinie (engl.: *Tidemark*) zur kalzifizierten Zone (Abb. 1). In der oberflächlichen Zone herrscht der geringste Proteoglykan-Anteil, Kollagenfibrillen sind in einer Position parallel zur Gelenkoberfläche angeordnet und die Chondrozyten sind abgeflacht und noch nicht vollständig ausdifferenziert<sup>6</sup>. Die Funktion dieser Zone ist hauptsächlich der Schutz der unteren Schichten gegen Scherspannung, Zug- und Druckkräfte bei Gelenkbewegung<sup>7</sup>. Die mittlere Zone beinhaltet eine geringe Anzahl differenzierter Chondrozyten in einer EZM reich an etwas dickeren Kollagenfibrillen und steigendem Anteil an Proteoglykanen. Die Zone dient als weitere Resistenz gegen Druckbelastungen, die durch willkürliche Orientierung der Komponenten jedoch noch keinen optimalen Schutz bietet<sup>6,7</sup>. In der radialen Zone mit höchstem Proteoglykan-Anteil befinden sich die dicksten und widerstandsfähigsten Kollagenfibrillen<sup>7</sup>. Diese sind meist in senkrechter Position zur Gelenkoberfläche orientiert und auch die Chondrozyten lagern sich säulenförmig in gleicher Position an, was dieser Zone ihre außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegen Druckbelastungen verleiht<sup>6,7</sup>. Die kalzifizierte Zone wird schließlich von Chondrozyten prähypertrophen und hypertrophen Phänotyps geprägt, die sich in einer dichten, kalzifizierten EZM reich an Typ-X Kollagen befinden<sup>6</sup>. Die

Kollagenfibrillen reichen von der radialen Zone über die (engl.) *Tidemark*-Trennungslinie in die kalzifizierte Zone und stabilisieren somit als Anker die Verbindung zwischen Knorpel und dem Übergang zur subchondralen Knochenplatte<sup>7</sup>. Diese wird wiederum durch die Zementlinie vom kalzifizierten Knorpel getrennt und geht letztlich in die subartikuläre Spongiosa über<sup>8</sup>.



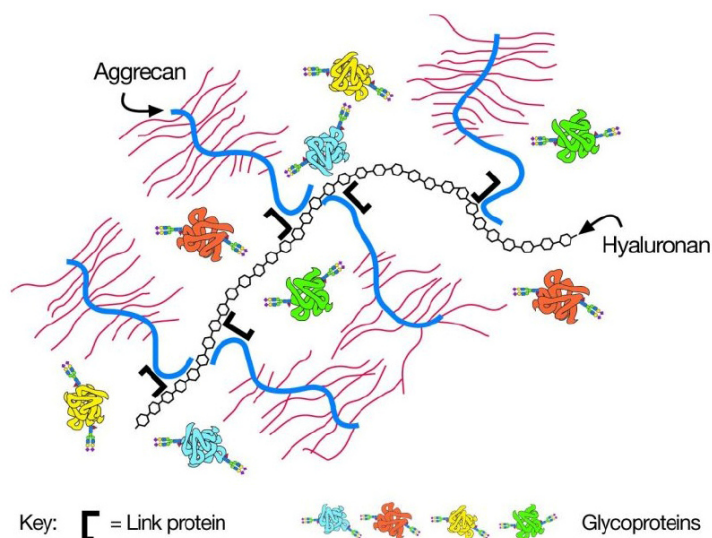
**Abb. 1:** A. Schematische Darstellung und B. Safranin-O/Fast Green Färbung des morphologischen Aufbaus von hyalinem Gelenkknorpel.

Abbildung A modifiziert nach Frisch & Cucchiari 2016<sup>9</sup>.

Chondrozyten machen nur ungefähr 2% des gesamten Knorpelvolumens aus und repräsentieren den einzigen Zelltyp innerhalb dieses Gewebes<sup>7</sup>. Sie entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (MSZ) über einen komplexen Prozess der chondrogenen Differenzierung, an dem unzählige wichtige Faktoren und Einflüsse beteiligt sind (siehe Kapitel 1.2). Die Bildung und Aufrechterhaltung der EZM-Komponenten sowie deren zonenspezifische

Verteilung zählen zu den wichtigsten Aufgaben der Chondrozyten<sup>7</sup>. Diese charakteristische EZM-Zusammensetzung mit Wasser, daran gebundenen Proteoglykanen und Typ-II Kollagen als Hauptbestandteile verleihen dem hyalinen Knorpel seine kennzeichnenden Eigenschaften wie mechanische Belastbarkeit und Elastizität<sup>6</sup>.

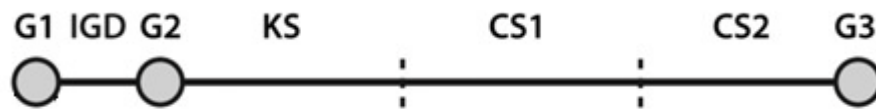
Proteoglykane sind überaus wichtige Bestandteile für die Widerstandsfähigkeit von Gelenkknorpel gegen Druckbelastungen. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei die hohen Konzentrationen negativer Ladungen, die eine Regulierung des osmotischen Drucks gemäß des Donnan-Prinzips erlauben<sup>10</sup>. Sie sind aus einem Kernprotein und einem oder mehreren kovalent verbundenen Glykosaminoglykanen (GAGs) aufgebaut, die sich wiederum aus wiederholenden Disaccharid-Einheiten bestehend aus Aminosucker und einer Uronsäure oder Galaktose zusammensetzen<sup>11</sup>. Es wird zwischen 5 verschiedenen GAG-Typen unterschieden: Hyaluronan (einziges nicht-sulfatiertes Proteoglykan), Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Heparansulfat und Keratansulfat. Hyalines Knorpelgewebe ist charakterisiert durch einen beachtlichen Anteil an Aggrekan (Chondroitinsulfat-Proteoglykan) in Form von Proteoglykan-Aggregaten in Verbindung mit Hyaluronan und Link Protein<sup>11,12</sup> (Abb. 2).



**Abb. 2:** Proteoglykan-Aggregat im Knorpelgewebe.

Abbildung übernommen von Esko *et al.* 2009<sup>11</sup>.

Das Kernprotein von Aggrekan besteht aus 3 globulären Regionen (G1 – 3) sowie einer interglobulären Domäne (IGD). Die G2 und G3 Regionen sind durch eine GAG Gruppe bestehend aus Keratansulfat (KS) und Chondroitinsulfat (CS) voneinander getrennt<sup>12</sup> (Abb. 3).



**Abb. 3:** Aufbau des Proteoglykans Aggrekan.

Abbildung modifiziert nach Roughley 2006<sup>12</sup>.

G1 – 3 = Kernproteinregionen; IGD = interglobuläre Domäne; KS = Keratansulfat; CS 1 – 2 = Chondroitinsulfat.

Kollagene existieren in der Knorpel-EZM in Form von Fibrillen<sup>3</sup>, die aus parallel gestaffelten Kollagenmolekülen aufgebaut sind. Ein Molekül besteht wiederum aus 3 Proteinketten, die zu einer rechtsgängigen Tripelhelix verdreht sind<sup>13,14</sup>. Die Proteinketten sind reich an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin und liegen in Form einer linksgängigen Spirale vor<sup>6</sup>. Hierbei ist Prolin hauptsächlich für die Ausbildung der Spiralstruktur zuständig, Hydroxyprolin hingegen sorgt für Stabilität der Tripelhelix<sup>6</sup>. Mehr als 95% der Gesamtkollagene im hyalinen Knorpel werden durch Typ-II Kollagen repräsentiert, das durch seine komplexe Struktur und durch die Bündelung zu dichten Fibrillen eine enorme Resistenz gegen Zugkräfte aufweist<sup>6</sup>.

### Knorpelverletzungen

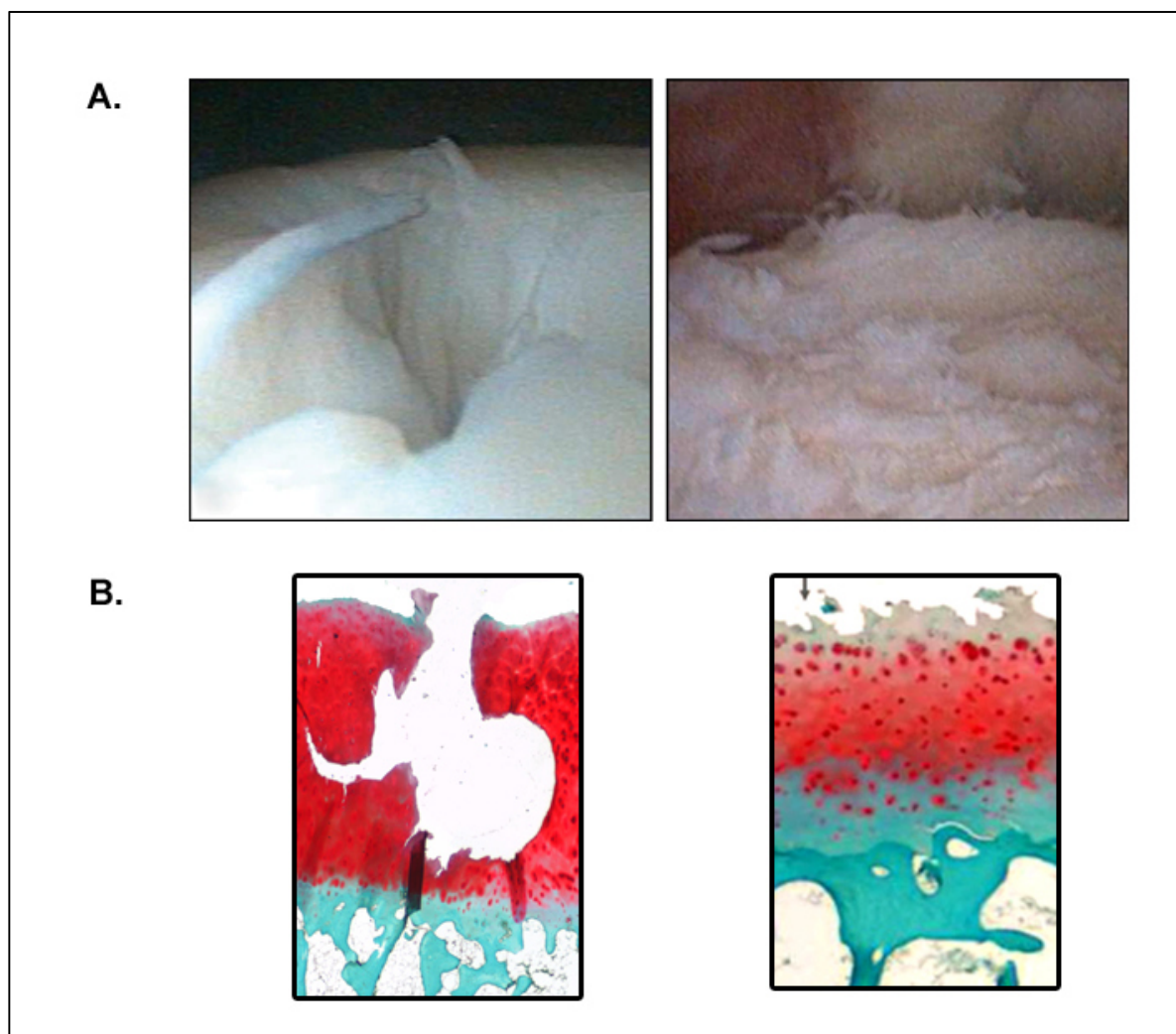
Verletzungen der Knorpelschicht können entweder lokal begrenzt als fokale Knorpeldefekte oder generalisiert in Form von Arthrose auftreten<sup>1,15</sup> (Abb. 4).

Fokale Defekte entstehen meist durch akute Traumata, können aber auch sekundär infolge von Osteonekrose oder (lat.) *Osteochondrosis dissecans* entstehen<sup>1</sup>. Es handelt sich um lokal begrenzte Defekte der Knorpeloberfläche mit unterschiedlicher Tiefe, die zu starken Schmerzen in den betroffenen Gelenken mit Bewegungseinschränkungen bis hin zum -verlust führen können. Es wird zwischen chondralen Defekten, die sich vollständig auf den Knorpel beschränken und wiederum in teilschichtige und vollschichtige Defekte unterteilt werden, und osteochondralen Defekten, die bis in den subchondralen Knochen reichen, unterschieden<sup>1,16</sup> (Abb. 5).

Bei einer generalisierten Arthrose (engl.: *Osteoarthritis* – OA) handelt es sich um eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung, die neben der Knorpelschicht auch beispielsweise den subchondralen Knochen, die Synovialmembran, Menisken, Bänder, Sehnen und Muskeln involviert<sup>16</sup> und deren klinische Symptome sich hauptsächlich durch Einschränkungen der Beweglichkeit, Schwellungen und chronische Schmerzen äußern<sup>16</sup>. Degenerative Prozesse, genetische Prädispositionen aber auch Überbelastung oder zugrunde liegende Primärerkrankungen der umliegenden Strukturen können zur Entstehung von Arthrose

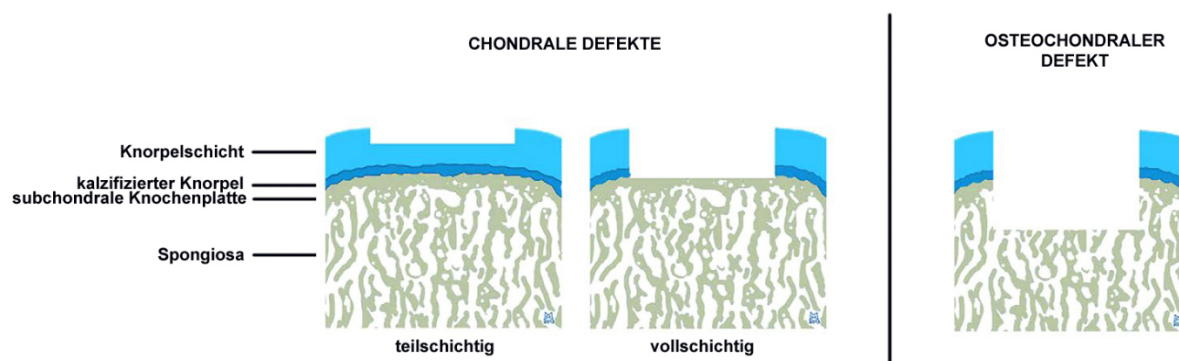


führen<sup>1</sup>. Auf molekularer Ebene werden vorwiegend entzündliche Prozesse und pathologische Veränderungen der Genexpressionsmuster der Chondrozyten eingeleitet, was zur Degradierung der Matrixkomponenten sowie Zellapoptose führt<sup>1</sup>. Die (engl.) *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) hat Arthrose in 6 Stadien eingeteilt, ausgehend von ausschließlich molekularen Veränderungen (Grad 1) zu mehrstufigen morphologischen Veränderungen, die von geringfügig aufgerauter Oberfläche (Grad 2), vertikalen Fissuren (Grad 3) und Erosionen (Grad 4) bis hin zur vollständigen Abtragung (Grad 5) und Deformation des Knorpels (Grad 6) reichen<sup>16</sup>.



**Abb. 4:** **A.** Arthroskopische Aufnahmen und **B.** Safranin-O/Fast Green Färbung eines lokal begrenzten Knorpeldefekts (links) und Arthrose (rechts) des Kniegelenks.

Teile der Abbildung übernommen von Orth *et al.* 2014<sup>1</sup> und Madry & Cucchiariini 2016<sup>2</sup>.



**Abb. 5:** Klassifizierung von Knorpeldefekten.

Abbildung modifiziert nach Cucchiari *et al.* 2014<sup>16</sup>.

Da der hyaline Knorpel nicht mit Blutgefäßen versorgt wird, besteht keine Möglichkeit der Einwanderung von Zellen mit reparativen Eigenschaften wie beispielsweise Stamm- oder Progenitorzellen, die in der Lage wären, neue Chondrozyten auszubilden und den Knorpel somit auf natürliche Art und Weise wiederherzustellen<sup>1</sup>. Die intrinsischen Reparaturmechanismen von chondralen Knorpeldefekten sowie die durch Arthrose bedingten Veränderungen beschränken sich demnach auf die Migration von gewebefremden Zellen aus den umliegenden Strukturen in die verletzten Bereiche<sup>1</sup>. Hierdurch wird jedoch nur eine vorübergehende Füllung der Defekte erreicht, die qualitativ nicht mit der Zusammensetzung und den charakteristischen Eigenschaften von hyalinem Knorpel zu vergleichen ist. Das Reparaturgewebe wird zudem nicht in den umliegenden Knorpel integriert und führt so mit der Zeit zu nekrotischen Veränderungen mit einer daraus folgenden Ausweitung der Defektgröße<sup>1,17</sup>. Osteochondrale Defekte haben den Vorteil, dass durch Eröffnung des subchondralen Knochens Zellen aus dem Knochenmark in die Defektregion einwandern können<sup>1,18</sup>. Im Knochenmark befinden sich multipotente mesenchymale Stammzellen, die in der Lage sind, zu Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren und den Knorpel sowie die verletzten Knochenbereiche zu regenerieren<sup>1</sup>. Das Reparaturgewebe entspricht jedoch nicht vollständig der natürlichen Zusammensetzung des hyalinen Knorpels. Verstärkte Typ-I statt Typ-II Kollagen Expression ist nachweisbar und es besteht keine vollständige Integration in die umliegende EZM des gesunden Gewebes<sup>5</sup>. Stattdessen kommt es zur teilweisen Apoptose<sup>1</sup> der Chondrozyten der angrenzenden Bereiche, was zum Verlust der Zellularität und somit zur Ausbildung eines Faserknorpels führt<sup>19</sup>. Dieser kann ohne angemessene Therapie im weiteren Verlauf erneut Degenerationsprozessen unterliegen, was wiederum zur Vergrößerung des ursprünglichen Defekts oder auch zur Entwicklung von Arthrose führen kann<sup>1</sup>.

### Therapieoptionen

Für die verschiedenen Arten der Erkrankungen des Knorpels werden unterschiedliche Therapien angewendet. Vollschiebtige, symptomatische, chondrale Defekte werden nach dem Vorbild der biologischen Prozesse behandelt, indem mit Hilfe von subchondralen Bohrungen, Mikrofrakturierungen oder Abrasionen eine Einwanderung von Zellen des Knochenmarks in die Defekte induziert wird<sup>1,20</sup>. Die tieferen, osteochondralen Defekte können unter anderem durch Transplantation von osteochondralen Zylindern behandelt werden, die aus gesunden Körperstellen entnommen werden<sup>1,21</sup>. Die Behandlung von Arthrose wird stadienabhängig durchgeführt, beginnend mit Gewichtsreduktion und moderater Bewegungs- und Physiotherapie, wahlweise in Kombination mit pharmakologischer Begleittherapie (Entzündungshemmer, Schmerzmittel)<sup>1</sup>. Je nach Ausprägung der Krankheit werden teilweise auch oben genannte Optionen oder Osteotomien angewendet, um eine Gewichtsverlagerung zu erzielen und die betroffenen Bereiche zu schonen<sup>1</sup>. Eine der wichtigsten Methoden zur Behandlung schwerwiegender Knorpelverletzungen ist die Transplantation von autologen Chondrozyten in Kombination mit biologisch abbaubaren Trägermaterialien (engl.: *Scaffolds*) in den Defektbereich (Autologe Chondrozytentransplantation – ACT)<sup>1,22</sup>.

Dennoch ist bisher keine der genannten Behandlungsmethoden dazu in der Lage, die natürliche Zusammensetzung von hyalinem Knorpel vollständig wiederherzustellen und zu erhalten<sup>1</sup>. Die Qualität und Zusammensetzung des Reparaturgewebes ist vergleichbar mit dem Faserknorpel, der infolge der dürftigen intrinsischen Reparaturmechanismen entsteht, und ist gekennzeichnet durch die Präsenz von Typ-I statt Typ-II Kollagen und geringer mechanischer Belastbarkeit<sup>4,23,24</sup>. Zu den Limitierungen der Transplantationsmethoden gehören unter anderem die Invasivität der Extraktionsmethoden sowie die Eigenschaft von Chondrozyten, ihren Phänotyp bei Expansion kritisch zu verändern<sup>15,25,26</sup>. Verbesserungen der Qualität des Reparaturgewebes sowie Vereinfachungen der Protokolle durch Modifikationen der Therapieoptionen oder auch durch neue, innovative Ansätze sind daher von großer Bedeutung für die Behandlung von Knorpelverletzungen.

## 1.2. Stammzellen in der Knorpelreparatur

### Allgemeines

Ein experimenteller Ansatz, um die Limitierungen der bisherigen Therapieoptionen zu bewältigen, ist die Transplantation von Stammzellen, die das Potential zur chondrogenen Differenzierung aufweisen und stärkere regenerative Eigenschaften besitzen als isolierte und expandierte Chondrozyten<sup>4,27-30</sup>. Stammzellen sind generell definiert durch ihre Fähigkeit zur Proliferation und Selbsterneuerung, ihre regenerativen Eigenschaften sowie ihr multipotentes

Differenzierungspotential, das von gewebsspezifischen Signalen und der lokalen Umgebung beeinflusst wird<sup>31,32</sup>. Es wird hauptsächlich zwischen 3 Stammzelltypen unterschieden: pränatale embryonale Stammzellen (ESZ)<sup>33-37</sup>, perinatale Stammzellen aus dem Fruchtwasser<sup>38-41</sup>, der Nabelschnur<sup>42-44</sup> oder der Plazenta<sup>45-47</sup> und postnatale oder adulte Stammzellen, zu denen unter anderem auch hämatopoetische Stammzellen (HSZ)<sup>48,49</sup> und mesenchymale Stammzellen gehören (MSZ)<sup>31,32,50</sup>. Eine relativ neue Art stellen differenzierte somatische Zellen dar, die mittels verschiedener Methoden in einen undifferenzierten Status zurückversetzt werden können, die sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSZ)<sup>51-57</sup>. Diese Methode ist allerdings bisher nur wenig erforscht. ESZ werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste entnommen und können extensiv expandiert werden, ohne dass sie ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren<sup>58</sup>, sind jedoch aufgrund ihrer Isolationsmethode ethisch umstritten. Perinatale Stammzellen können unter geringeren ethischen Gesichtspunkten isoliert und in großem Umfang expandiert werden ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren<sup>40</sup>. Die Isolation von adulten Stammzellen hingegen umgeht die ethischen Probleme vollständig und bietet weitere Vorteile zur Anwendung im Bereich der Medizin wie beispielsweise die Möglichkeit der autologen Transplantation sowie verminderte tumorigene Eigenschaften durch unterschiedliche epigenetische Regulierung<sup>59</sup>.

### Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

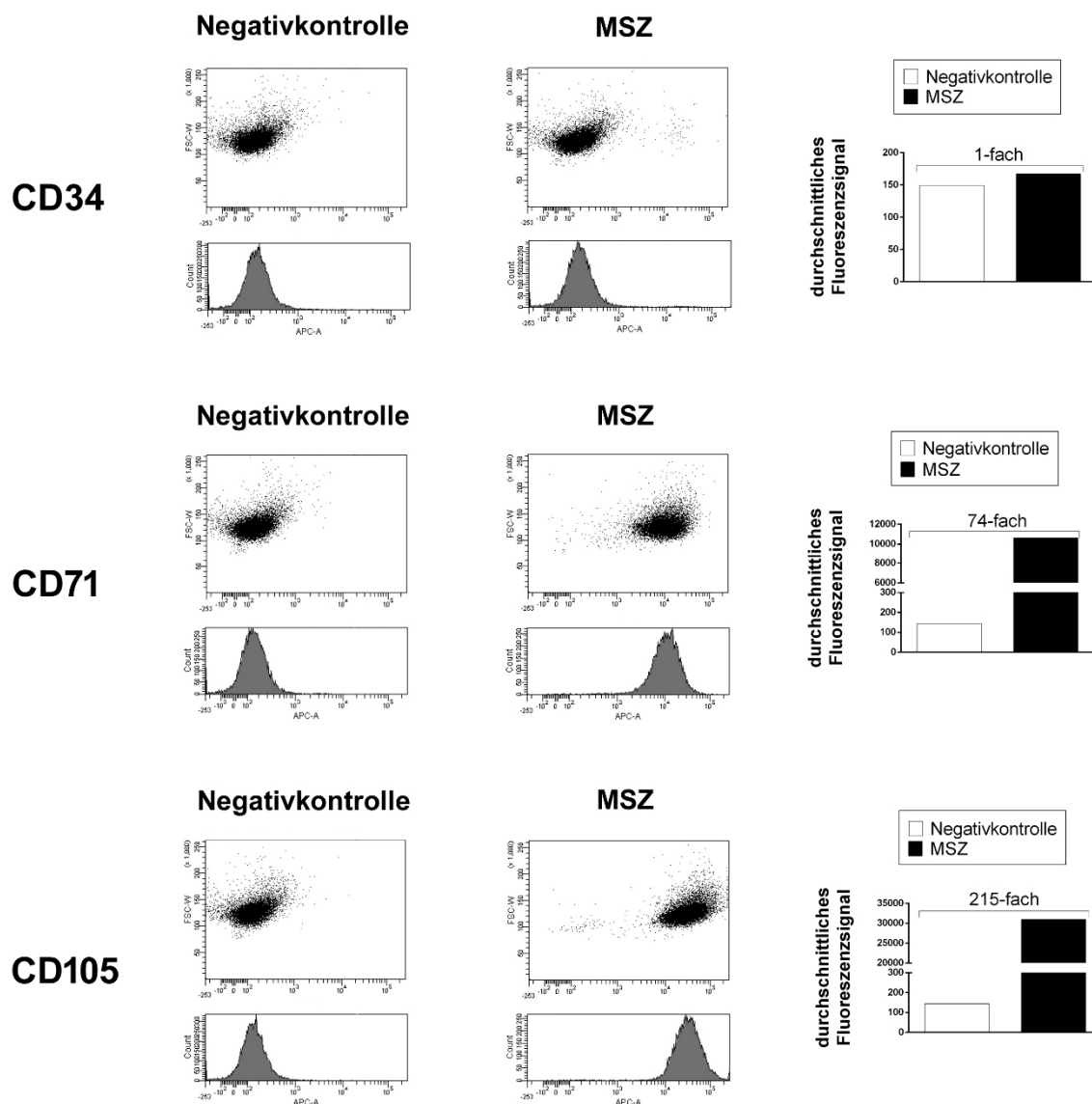
Mesenchymale Stammzellen (MSZ) haben die Fähigkeit, zu verschiedenen Zelltypen mesodermalen Ursprungs (z. B. Knorpel, Knochen, Fett, Muskeln, Bänder und Sehnen) zu differenzieren<sup>60</sup> und gewinnen immer mehr an Bedeutung für klinische und experimentelle Strategien zur Behandlung von Knorpelverletzungen, da sie neben ihrem chondrogenen Differenzierungspotential sowohl trophische als auch immunmodulatorische Eigenschaften für Zellen der angrenzenden Knorpelbereiche aufweisen<sup>15,61-65</sup>. Die 3 Hauptlinien der Plastizität von MSZ sind definiert durch Chondrogenese (Differenzierung zu Knorpelzellen, chondrogene Differenzierung), Adipogenese (Differenzierung zu Fettzellen, adipogene Differenzierung) und Osteogenese (Differenzierung zu Knochenzellen, osteogene Differenzierung). Das (engl.) *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* der (engl.) *International Society for Cellular Therapy* hat bestimmte Kriterien definiert, um MSZ eindeutig zu charakterisieren: es handelt sich um Plastik-adhärenzte Zellen mit positiver Expression von CD105, CD73, CD71 und CD90 sowie fehlender Expression von CD45, CD34, CD14, CD79α und HLA-DR, die unter bestimmten Kulturbedingungen in der Lage sein müssen, zu Chondrozyten, Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren<sup>15,66,67</sup>.

Adulte MSZ sind in einer Vielzahl von Geweben präsent, wie beispielsweise in Fettgewebe (engl.: *Adipose-derived* MSZ – ASZ), der Synovialmembran (engl.: *Synovial-derived* MSZ –

SDZ), dem Perichondrium/Periosteum (PP-MSZ) oder der Spongiosa<sup>15,68-70</sup>. Die beliebteste und meist erforschte Quelle ist das Knochenmark<sup>32,64,71</sup>, das trotz des relativ geringen MSZ-Anteils von ungefähr  $\leq 1\%$  die verlässlichste und reichste MSZ-Quelle darstellt<sup>72</sup>. Mehrere (engl.) *Proof-of-Concept* Studien haben die Eignung solcher aus Knochenmark isolierter MSZ (engl.: *‘Bone Marrow’* MSZ – BM-MSZ) für die Knorpelreparatur unter Beweis gestellt<sup>73-76</sup> und auch in klinischen Studien werden BM-MSZ Transplantationen bereits zur Behandlung von Knorpeldefekten<sup>77-81</sup> und Arthrose<sup>27,82-84</sup> eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden MSZ nach Routineprotokollen<sup>85</sup> aus dem Knochenmark von Patienten isoliert, die sich einer vollständigen Knie-Arthroplastik unterzogen haben. FACS-Analysen zur Überprüfung ausgewählter Expressionsmuster (CD34<sup>-</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>) wurden aufgrund der ausreichenden Literaturnachweise bezüglich der Eignung von Knochenmark zur Isolation von MSZ<sup>32,64,71</sup> sowie der langjährigen Etablierung und Verifikation der genutzten Protokolle ausschließlich stichprobenartig durchgeführt und bestätigten eine fehlende Expression von CD34 sowie eine im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich ausgeprägte Expression von CD71 und CD105 (Abb. 6).

Eine Vereinfachung der Nutzung isolierter MSZ in Form eines Einschrittverfahrens ist die direkte Anwendung des Knochenmarks selbst, die auch bereits in der Klinik Anwendung findet<sup>86-89</sup>. Vorteil dieser einstufigen Prozesse ist, dass sich die Stammzellen in ihrer natürlichen Umgebung befinden und somit von parakrinen Effekten der benachbarten Zellen sowie der EZM profitieren können<sup>90</sup>. Einige der Hauptkomponenten des Knochenmarks sind neben multipotenten MSZ (~1%) beispielsweise hämatopoetische Stamm- (HSZ) und Vorläuferzellen, Endothelzellen, Makrophagen, Adipozyten, Fibroblasten oder Osteoprogenitorzellen<sup>50</sup>, die alle eine positive Expression von CD45 aufweisen. Unter speziellen chondrogenen Kultivierungsbedingungen sind trotz der Vielzahl an unterschiedlichen Zellsubpopulationen jedoch weiterhin hauptsächlich die mesenchymalen Stammzellen an den chondroregenerativen Prozessen beteiligt<sup>91,92</sup>. Es wurde gezeigt, dass CD45<sup>+</sup> Zellen bezüglich der chondrogenen Differenzierung der MSZ sogar stimulatorische Effekte aufweisen, womöglich durch die parakrine Produktion chondrogener Faktoren wie beispielsweise SOX9<sup>50</sup>. Die biologische Umgebung, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielen demnach eine außerordentliche Rolle für beinahe alle relevanten Eigenschaften der MSZ und müssen sowohl für *in vitro* als auch für *in vivo* Experimente sowie klinische Studien berücksichtigt werden<sup>90</sup>.



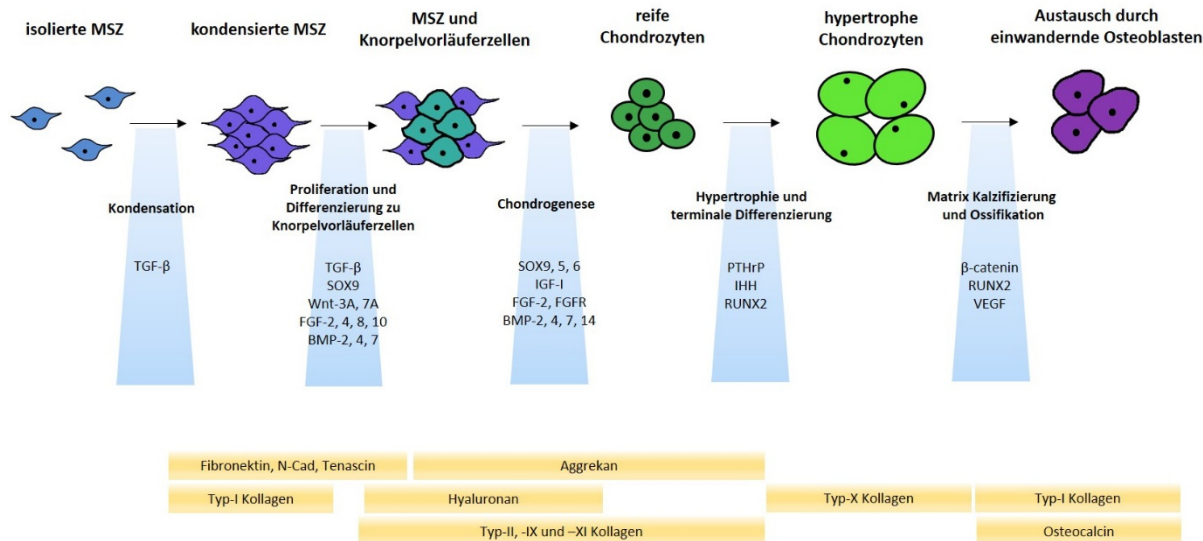
**Abb. 6:** Stichprobenartige FACS-Analysen zur Überprüfung ausgewählter Charakterisierungsmerkmale von aus Knochenmark isolierten MSZ.

Die Zellisolation fand nach Routineprotokollen unmittelbar nach Probenentnahme statt. Die Zellen wurden anschließend in Monolayer-Kulturen expandiert, kultiviert und nach 6 Wochen mittels FACS-Analyse auf die Expression von CD34, CD71 und CD105 untersucht. Die Charakterisierungskriterien für mesenchymale Stammzellen wurden durch die hier erhaltenen Ergebnisse (fehlende Expression von CD34, stark ausgeprägte Expression von CD71 und CD105) klar bestätigt. Identische Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt (3 Wochen nach Isolation, Daten nicht gezeigt) zeigten vergleichbare Ergebnisse. MSZ = Mesenchymale Stammzelle; FACS = (engl.) *Fluorescence-activated Cell Sorting*; CD = (engl.) *Cluster of Differentiation*

### Mesenchymale Stammzellen in der Skelettentwicklung

MSZ sind Grundgerüst der endochondralen Ossifikation, einem der wichtigsten Vorgänge der embryonalen Skelettentwicklung, die meist am komplexen Modell der Extremitätenentwicklung beschrieben wird. Der gesamte Prozess wird von einer Vielzahl an Faktoren gesteuert und

jede einzelne Phase ist durch die Expression charakteristischer Marker gekennzeichnet (Abb. 7).



**Abb. 7: Prozess der endochondralen Ossifikation.**

Abbildung modifiziert nach Frisch & Cucchiariini 2016<sup>9</sup>.

Blau hinterlegt: beteiligte Faktoren. Gelb hinterlegt: Matrixkomponenten. MSZ = Mesenchymale Stammzelle; TGF = (engl.) *Transforming Growth Factor*; SOX = (engl.) *SRY [Sex-determining Region Y]-related HMG [High-Mobility Group] Box*; Wnt = (engl.) *Drosophila Segment Polarity Gene wingless and Vertebrate Homolog integrated int-1*; FGF = (engl.) *Fibroblast Growth Factor*; BMP = (engl.) *Bone Morphogenetic Protein*; PTHrP = (engl.) *Parathyroid Hormone-related Protein*; IHH = (engl.) *Indian Hedgehog*; RUNX = (engl.) *Runt-related Transcription Factor*; VEGF = (engl.) *Vascular Endothelial Growth Factor*; N-Cad = N-Cadherin.

Im ersten Schritt nach MSZ Proliferation kommt es zur Ausbildung von Zellclustern, wodurch die Zellmasse pro Fläche erhöht wird ohne weiteres Proliferationsverhalten aufzuweisen (MSZ Kondensation<sup>9,93</sup>). Dieser Prozess basiert hauptsächlich auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, die zu verstärkter Zelladhäsion mit der Ausbildung interzellulärer Verbindungen führen<sup>94-96</sup>. Den größten Anteil haben hieran die Zelladhäsionsmoleküle N-Cadherin (Calcium-abhängig<sup>97</sup>) und N-CAM (engl.: *Neural Cell Adhesion Molecule*) sowie Hyaluronidase und die Expression spezifischer EZM Moleküle wie Typ-I-Kollagen<sup>9,93-97</sup>.

Die Chondrogenese selbst ist ein zweistufiger Prozess, ausgehend von der Differenzierung der kondensierten Stammzellen zu Knorpelvorläuferzellen mit anschließender weiterer Reifung zu ausdifferenzierten proliferierenden Chondrozyten<sup>95</sup>. In dieser Phase kommt es zu einer wichtigen Umorganisation der Matrixkomponenten, charakterisiert durch einen steigenden Anteil an Hyaluronan sowie durch den Wechsel von Typ-I Kollagen zur knorpelspezifischen Expression von Aggrekan und Typ-II Kollagen, Typ-IX und Typ-XI Kollagen<sup>9,93-95</sup>. Eine weitere wichtige Veränderung innerhalb dieser Phase ist der



morphologische Übergang der Zellen zur charakteristischen runden Form der differenzierten Chondrozyten<sup>9,93,96-98</sup> (Abb. 7). Die Differenzierungsvorgänge und die Bildung der Matrixkomponenten werden von verschiedenen wichtigen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren gesteuert, Hauptvertreter sind hierbei SOX9 (engl.: *SRY [Sex-determining Region Y]-related HMG [High-Mobility Group] Box 9*) und TGF- $\beta$  (engl.: *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) mit den stärksten chondrogenen Eigenschaften, aber auch weitere wichtige Faktoren wie IGF-I (engl.: *Insulin-like Growth Factor I*), FGF-2 (engl.: *Fibroblast Growth Factor*) und BMP's (engl.: *Bone Morphogenetic Proteins*)<sup>94,95,97-99</sup>.

Die differenzierten Chondrozyten sind die Grundlage zur Ausbildung von hyalinem Knorpel, kommt es jedoch durch Einfluss charakteristischer Faktoren zur terminalen Differenzierung, entwickeln sich die Chondrozyten vom prähypertrophen zum hypertrophen Phänotyp, charakterisiert durch eine auffallende Volumenvergrößerung (Hypertrophie)<sup>9,95,100</sup>. Dieser Schritt ist Voraussetzung für die Matrix-Kalzifizierung und die folgende Einwanderung von Osteoblasten zur Ausbildung von Knochengewebe (Ossifikation). Die Hypertrophie wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor RUNX2 (engl.: *Runt-related Transcription Factor 2*) gesteuert und basiert zusätzlich auf negativen Rückkopplungssignalen von PTHrP (engl.: *Parathyroid Hormone-related Protein*) und IHH (engl.: *Indian Hedgehog*)<sup>9,95,96</sup>. Hauptmerkmal hypertropher Chondrozyten ist der bis zu 20-fache Volumenanstieg sowie die Expression von Typ-X statt Typ-II Kollagen als wichtigster EZM Bestandteil<sup>9,95,97,100,101</sup>.

Der finale Schritt der endochondralen Ossifikation ist letztlich charakterisiert durch Apoptose der hypertrophen Chondrozyten, begleitet von der Expression des (engl.) *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) mit daraus folgender Ausbildung von Blutgefäßen (Angiogenese)<sup>96,100</sup>. Über die neu synthetisierten Gefäße wandern Osteoblasten in die hypertrophen Zonen ein, die die apoptotischen Chondrozyten ersetzen und somit den Weg zur Knochenbildung ebnen<sup>9,93</sup>. Die eingewanderten Osteoblasten sind letztlich verantwortlich für die endgültige Matrix-Umgestaltung durch Expression von Typ-I Kollagen und Osteocalcin<sup>95</sup>. Dieser Prozess ist abhängig vom Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg (Wnt = (engl.) *Drosophila Segment Polarity Gene wingless and Vertebrate Homolog integrated int-1*) sowie der Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP's) und von verschiedenen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren mit RUNX2 als Hauptvertreter<sup>9,95,98,101</sup>.

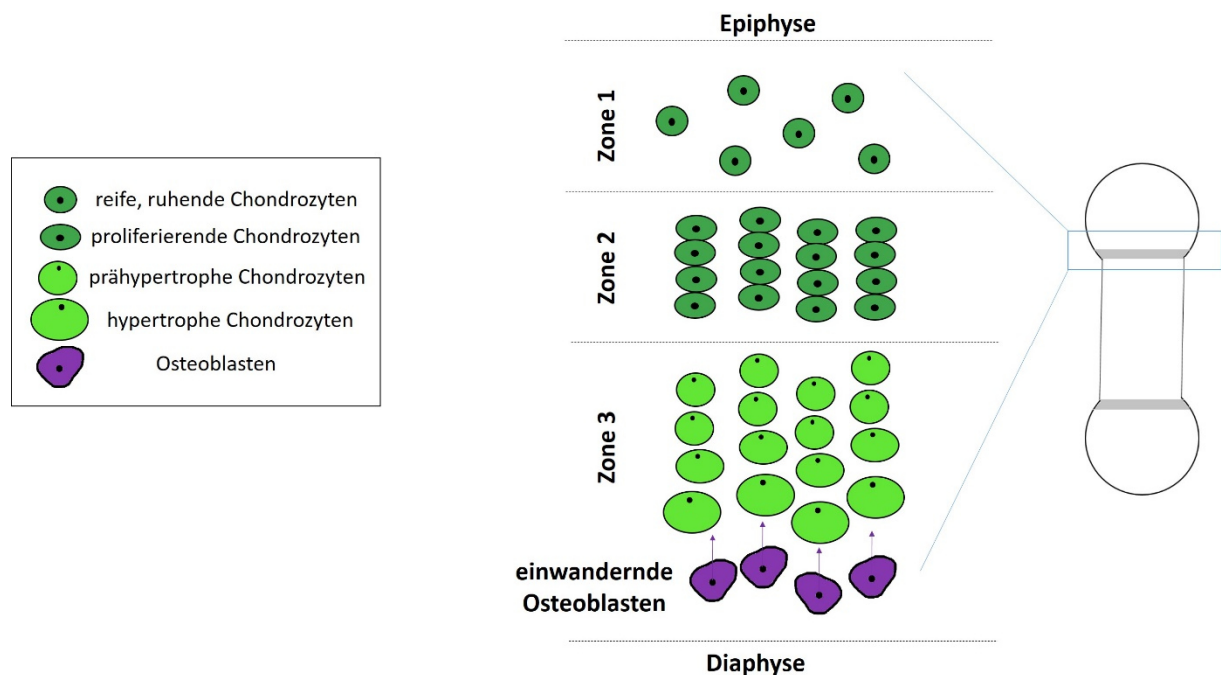
Die endochondrale Ossifikation ist demnach ein komplexes Modell zur embryonalen Entwicklung von Knorpel und Knochen, in welchem jede Phase von charakteristischen Faktoren beeinflusst wird und gleichzeitig eine stadienspezifische Zusammensetzung der EZM mit sich bringt. Anhand dieses Modells lässt sich auch der typische Aufbau des hyalinen



Knorpelgewebes erklären: Zone 1 (mittlere Zone, Abb. 1) beinhaltet ruhende Chondrozyten, die sich im weiteren Verlauf nach Reifung und Proliferation in Säulen aus schnell teilenden Zellen anordnen (Zone 2, radiale Zone, Abb. 1). Zone 3 (kalzifizierte Zone, Abb. 1) ist durch hypertrophe Chondrozyten charakterisiert, die letztlich aus dem Zellzyklus aussteigen und durch Osteoblasten ersetzt werden<sup>102</sup> (subchondraler Knochen).

### Wichtige Parameter bei der Anwendung zur Knorpelreparatur

Zwischen dem Aufbau von hyalinem Gelenkknorpel (Abb. 1) und dem Knorpel der Wachstumsfuge (Abb. 8), der durch endochondrale Ossifikation ausgebildet wird, besteht eine gewisse Ähnlichkeit. Zone 1 besteht aus reifen, ruhenden Chondrozyten, die nach Proliferation (Zone 2) zum hypertrophen Phänotyp übergehen (Zone 3) und letztlich durch einwandernde Osteoblasten ersetzt werden (Abb. 8). Demnach wird bei der Anwendung von MSZ zur Knorpelreparatur in der Theorie davon ausgegangen, dass der Prozess der chondrogenen Differenzierung dem Modell der endochondralen Ossifikation (Abb. 7) folgt. Bei chondrogener Stimulation der MSZ (beispielsweise durch spezielles chondrogenes Medium und/oder Gentherapie) ist daher wichtig, das Stadium der reifen Chondrozyten genau abzustimmen, ohne dass es zur terminalen Differenzierung mit Ausbildung des hypertrophen Phänotyps kommt. Werden MSZ zur Knorpelreparatur eingesetzt, ist es demnach von großer Bedeutung, neben der chondrogenen Differenzierung auch hypertrophe Eigenschaften zu untersuchen.



**Abb. 8:** Aufbau der Wachstumsfuge mit Einteilung der Zonen und beteiligten Zelltypen.

Abbildung modifiziert nach Frisch & Cucchiari 2016<sup>9</sup>.

### 1.3. Gentherapie

#### Allgemeines

Die genetische Manipulation eukaryotischer Zellen für experimentelle und therapeutische Zwecke ist bereits seit über 40 Jahren eine attraktive Strategie der allgemeinen Forschung<sup>103</sup>. Meist werden hierbei Gene eingesetzt, die aktiv zur Bekämpfung oder Unterdrückung einer großen Bandbreite von Erkrankungen beitragen sollen. Im Bereich der Knorpelforschung stellt die genetische Veränderung von isolierten MSZ oder Knochenmark ein wichtiges und neuartiges Instrument zur weiteren Verbesserung der Therapieoptionen dar. Hierbei können fremde Gene oder Gensequenzen in die Zellen eingebracht werden, deren Expression idealerweise aktiv die Knorpelneubildung fördern soll. Als Werkzeug zur Gentherapie dienen nichtvirale (Transfektion) und virale Transfersysteme (Transduktion). Ohne Zweifel repräsentieren nichtvirale Methoden wie Elektroporation oder Mikroinjektion den für den Patienten sichersten Prozess der genetischen Manipulation, die Transgenexpression ist jedoch nur wenig effizient und von kurzer Dauer<sup>15,103,104</sup>. Virale Transfersysteme hingegen sind aufgrund der natürlichen Integrationswege stabiler und effektiver, besitzen jedoch aufgrund ihrer teilweise immunogenen und toxischen Wirkung diverse Nachteile<sup>15,103,104</sup>. Bei der Herstellung viraler Gentransfervektoren werden zunächst eukaryotische Gene in prokaryotische Plasmide einkloniert, die dann in ihrem natürlichen Organismus vermehrt werden und anschließend zur Neuorganisation viraler DNA (= Rekombination) benutzt werden. Solche rekombinanten viralen Vektoren werden schließlich benutzt, um auf dem biologischen Weg der Wirtszellinfektion ihre DNA im menschlichen Genom zu integrieren und dort zu vervielfältigen, was letztlich in der Transgenexpression resultiert. Die hauptsächlich hierfür verwendeten Viren sind Adenoviren, Retro- oder Lentiviren sowie Herpes Simplex Viren<sup>15</sup>. Vektoren des Adenovirus und des Herpes Simplex Virus sind hocheffizient, erlauben jedoch nur kurzweilige Transgenexpression mit schädlichen Nebeneffekten<sup>15</sup>. Retro- und lentivirale Vektoren führen zur stabilen Integration ins Wirtszellgenom und garantieren somit hohe Effizienz und Stabilität der Transgenexpression, bergen aber das Risiko der Insertionsmutagenese<sup>15</sup>. Die Anwendung von adeno-assoziierten Viren als Basis für Gentherapieansätze repräsentiert ein relativ neues, hocheffizientes Transfersystem, das den bisher aufgeführten Systemen in mehreren Punkten überlegen ist. Die sogenannten rekombinanten adeno-assoziierten viralen (rAAV) Vektoren sind durch komplette Entfernung der viralen Sequenzen ein sicheres Werkzeug zur genetischen Manipulation von Zellen, sind weniger immunogen und toxisch und können sowohl teilungsfähige (z.B. MSZ) aber auch nicht teilungsfähige Zellen (z.B. Chondrozyten) mit hoher Effizienz (bis zu 95%) und über lange Zeiträume (mindestens 150 Tage) transduzieren<sup>2</sup>. Hierbei liegen sie hauptsächlich als stabile Episomen neben der chromosomalen DNA im Zellkern vor und werden nur geringfügig ins

Wirtszellgenom integriert, wodurch das Risiko zur Insertionsmutagenese deutlich verringert wird<sup>15</sup>.

### Gentherapie in der Klinik

Der erste autorisierte Gentransfer im Menschen wurde im Jahre 1989 durchgeführt, als Rosenberg und Kollegen retroviral-veränderte Tumor-infiltrierende Lymphozyten als Immuntherapie bei malignen Melanomen eingesetzt haben<sup>105</sup>. Die Verträglichkeit der Behandlung war bei allen Studienteilnehmern zufriedenstellend und es wurden keine Nebenwirkungen der Gentherapie beobachtet. Seitdem stieg die Anzahl der klinischen Gentherapie-Studien rapide an, wobei immer mehr Variationen bezüglich der Transfersysteme verfügbar wurden, aber auch Einschlüsse im Bereich der Toleranz und Sicherheit bei den Patienten beobachtet wurden. Von den insgesamt mehr als 1300 klinischen Studien wurden vorwiegend nichtvirale Systeme (~ 25%) oder adenovirale (~ 25%) beziehungsweise retrovirale Vektoren (~22%) eingesetzt. rAAV Vektoren hingegen wurden nur vergleichsweise wenig verwendet (~ 3,5%)<sup>106</sup>, umfassen jedoch ein beachtliches Krankheitsfeld wie beispielsweise Stoffwechselerkrankungen<sup>107</sup>, Gerinnungsstörungen<sup>108</sup> sowie Erkrankungen des Nervensystems<sup>109,110</sup>, der Netzhaut<sup>111</sup> oder der Muskeln<sup>112</sup>, aber auch Gelenkerkrankungen wie rheumatoide Arthritis<sup>113-116</sup> oder Arthrose<sup>117-119</sup>. Das erste kommerziell erhältliche Gentherapie-Produkt wurde 2005 in China auf den Markt gebracht (Behandlung des Kopf-Hals-Karzinoms<sup>106,120</sup>). In Europa wurde 2012 das Produkt Glybera® autorisiert, ein auf rAAV Vektoren basierendes Medikament gegen den Lipoproteinlipase-Defekt<sup>121</sup> (Stoffwechselerkrankung).

Im Jahr 1999 wurde das optimistische Bild der neuen Therapiemöglichkeit erstmals in Frage gestellt, als ein Patient infolge eines Zytokinsturms nach adenoviraler Gentherapie gegen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz (Erkrankung des Harnstoffzyklus) innerhalb von 4 Tagen im Anschluss an die Behandlung verstarb<sup>106,122</sup>. Ein weiterer Fall ereignete sich 2002, als durch die Behandlung der X-SCID Immunschwäche durch Gentherapie mit Retroviren die Entwicklung von Leukämie dokumentiert wurde<sup>106,123</sup>. Dennoch wurde die Gentherapie im klinischen Bereich nicht vollständig aufgegeben, etliche weitere Studien wurden autorisiert und seither wurden keine vergleichbaren Fälle mit Todesopfern als Folge der Gentherapie beobachtet. Im Jahr 2007 verstarb eine 36-jährige Frau nach wiederholter Injektion von rAAV Vektoren, woraufhin die Studie von der (engl.) *Food and Drug Administration* (FDA) eingestellt wurde. Nach eingängiger Untersuchung konnte jedoch nicht erwiesen werden, dass die Todesursache auf die Gentherapie zurückzuführen ist. Obwohl vor allem die wiederholte Gabe des Medikaments einige Nebeneffekte wie immunologische Reaktionen durch neutralisierende Antikörper hervorgerufen haben könnte, wurde als Hauptursache des

Versterbens eine Histoplasmose infolge einer Pilzinfektion der Patientin diagnostiziert<sup>106</sup>. Auch wenn ein Einfluss des Gentransfers auf den Tod der Patientin nicht vollständig auszuschließen war, wurde die Studie schließlich von der FDA ungefähr ein halbes Jahr später unter leicht verschärften Auflagen wieder freigegeben<sup>106</sup>. Diese Freigabe stellte einen wichtigen Schritt für die weitere Nutzung von rAAV Vektoren für gentherapeutische Zwecke dar.

### Gentransfer in der Knorpelreparatur

Gentherapie zur Behandlung von Gelenkverletzungen ist ein breit gefächertes und überaus wichtiges Forschungsgebiet mit einer Vielzahl an Variablen wie beispielsweise Zelltypen und Vektorsysteme, aber auch Kultivierungsmethoden und Studiendesigns (*in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, *in vivo* bis hin zu klinischen Studien). Evans *et al.*<sup>116</sup> und Wehling *et al.*<sup>114</sup> transplantierten beispielsweise *ex vivo* retroviral transduzierte Synovialzellen (Transgen: (engl.) *Interleukin 1 Receptor Antagonist*), um Patienten mit rheumatoider Arthritis zu behandeln, wohingegen Mease *et al.*<sup>113</sup> eine direkte Injektion adeno-assoziiierter viraler Vektoren (Transgen: Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) Rezeptorantagonist) zur Behandlung der gleichen Krankheit bevorzugten. Im Bereich der Arthrose wurden bisher nur von 2 Arbeitsgruppen klinische Gentherapie-Studien dokumentiert, die sich beide mit der Implantation retroviral transduzierter Chondrozyten (Transgen: (engl.) *Transforming Growth Factor  $\beta$* ) befassen<sup>119,124,125</sup>. Eine Anwendung der Gentherapie zur Behandlung von fokalen Knorpeldefekten sowie Transplantationen genetisch modifizierter MSZ oder Knochenmarkaspirate in klinischen Studien ist bisher nicht bekannt, bietet jedoch aufgrund der vielseitigen vorteilhaften Eigenschaften der Stammzellen eine attraktive Alternative.

Mehrere *in vitro* Studien testeten bereits eine Bandbreite an chondroreparativen Genen für den Gentransfer in MSZ und vielen dieser Faktoren konnte hierbei ein stimulatorischer Effekt bezüglich der chondrogenen Differenzierung nachgewiesen werden, wie beispielsweise<sup>15</sup>:

- ECM Moleküle: (engl.) *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* – COMP<sup>126</sup>
- Wachstumsfaktoren: (engl.) *Bone Morphogenetic Proteins* - BMPs<sup>127</sup>, (engl.) *Basic Fibroblast Growth Factor* - FGF-2<sup>85</sup>, (engl.) *Human Telomerase* - hTERT<sup>128</sup>
- Transkriptionsfaktoren: (engl.) *Sex-determining Region Y-type High Mobility Group Box* – SOX5, 6, 9<sup>129-133</sup>, (engl.) *Zinc-finger Protein 145* - ZNF145<sup>134</sup>
- Signalmoleküle: (engl.) *Indian Hedgehog* - IHH<sup>135</sup>
- (engl.) *small interfering RNA* (siRNA): anti-p53<sup>136</sup>, anti-RUNX2/Cbfa1<sup>137,138</sup>

Die Transplantation von genetisch modifizierten MSZ wurde auch in relevanten *in vivo* Studien zur Behandlung von Arthrose und fokalen Defekten bereits erfolgreich durchgeführt,

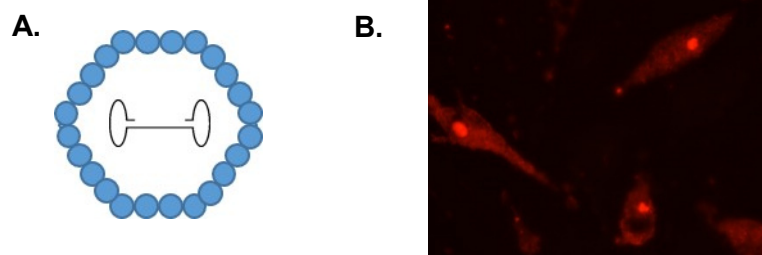
beispielsweise<sup>15</sup> mit einer über verschiedene Vektorsysteme vermittelten Überexpression von SOX9<sup>139</sup>, (engl.) *B-cell Lymphoma Extra Large* - Bcl-xl<sup>140</sup>, (engl.) *Carilage-derived Morphogenetic Protein 1* - CDMP1<sup>141</sup>, ZNF145<sup>134</sup>, BMP-2<sup>142</sup>, BMP4<sup>143</sup> sowie dem (engl.) *Connective Tissue Growth Factor* - CTGF<sup>144</sup>. Ein detaillierter Überblick über den aktuellen Fortschritt der Anwendung von genetisch modifizierten Stammzellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Übersichtsartikel zusammengefasst<sup>15</sup>.

Über die genetische Manipulation von Knochenmarkaspiraten hingegen ist allgemein bisher nur vergleichsweise wenig bekannt. Die wenigen relevanten Studien befassten sich hauptsächlich mit adenoviralem Gentransfer<sup>145-147</sup>, wobei zwar eine effektive, aber trotz hoher Vektordosen nur kurzzeitige Transgenexpression für TGF- $\beta$ , BMP-2 oder IHH nachgewiesen werden konnte. Die ersten Ergebnisse zum Gentransfer mittels rAAV Vektoren wurden erst kürzlich veröffentlicht<sup>148</sup>, wobei eine Transduktionseffizienz von bis zu 90% über einen Zeitraum von mindestens 125 Tage nachgewiesen wurde, ohne dass die Behandlung mit rAAV Vektoren toxische Effekte aufwies oder Einfluss auf die chondrogene Differenzierung zeigte.

### Adeno-assoziierte Viren

#### *Biologische Struktur*

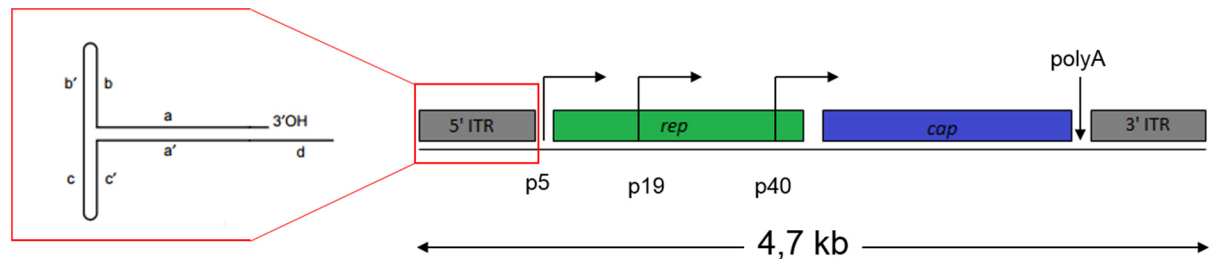
Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Gattung der Dependoviren und wurden 1965 als Kontamination von Adenovirus-Präparationen entdeckt<sup>149,150</sup>. Der Gattungsname unterstreicht die Abhängigkeit des AAV von einem Helfervirus zur effektiven Wirtsinfektion. Es handelt sich um nicht-replikative Viren (20 – 25 nm im Durchmesser, Abb. 9) ikosahedraler Form mit eingekapseltem, einzelsträngigem 4,7 kb großem DNA Genom<sup>151</sup>.



**Abb. 9:** **A.** Schematische Darstellung eines AAV-Partikels; **B.** Fluorochrom(Cy3)-markierte AAV-2 Partikel in mesenchymalen Stammzellen.

Das AAV-2-Genom wird von den T-förmigen (engl.) *Inverted Terminal Repeats* (ITRs) umrandet, die sich aufgrund ihrer multipalindromischen Natur durch komplementäre Paarungen mit sich selbst falten können und somit die Struktur einer Haarnadel annehmen<sup>149</sup> (Abb. 10). Diese flankieren die viralen Gene *rep* (engl.: *replication*, kontrollierte Expression

durch Promotor-Sequenzen p5 und p19) und *cap* (engl.: *capsid*, kontrollierte Expression durch Promotor-Sequenz p40)<sup>149</sup> (Abb. 10).



**Abb. 10:** Wildtyp AAV-2 Genom mit vergrößerter Darstellung der 5' ITR.

Abbildung modifiziert nach Cucchiariini 2009<sup>103</sup> und Snyder & Flotte 2002<sup>152</sup>.

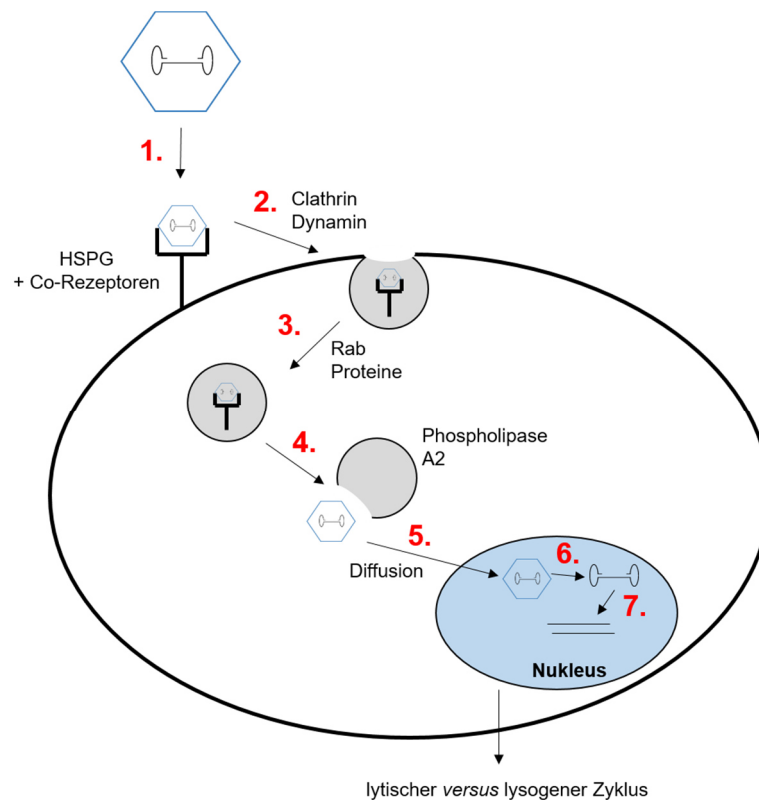
AAV = Adeno-assoziiertes Virus; OH = Hydroxygruppe; ITR = (engl.) *Inverted Terminal Repeat*; rep = AAV-Gen für Replikation; cap = AAV-Gen für Capsidbildung; polyA = Polyadenylierungssignal; kb = Kilobasen.

Bisher wurden 12 AAV Serotypen entdeckt, wovon AAV-2 bisher jedoch am eingängigsten studiert wurde und somit als Prototyp der AAV Familie dient<sup>151</sup>. In der menschlichen Population herrscht eine große Seroprävalenz des Virus (~80% seropositiv für AAV-2), die jedoch lange nicht mit Krankheiten assoziiert wurde<sup>149</sup>. Demnach sind AAV weitestgehend in der Lage, sich innerhalb des Wirts zu replizieren und zu bestehen, ohne dabei der Wirtszelle zu schaden<sup>153</sup>, was sie als attraktives Werkzeug im Bereich der Gentherapie identifiziert. Im Jahr 2007 wurde erstmals eine mit AAV verbundene Pathogenität durch die Entstehung von Leberzellkarzinomen (engl.: *Hepatocellular Carcinoma* – HCC) nach systemischer Injektion eines rAAV Vektors festgestellt<sup>154</sup>. Chandler *et al.* haben diesbezüglich erst kürzlich eine umfangreiche Studie mit Mäusen durchgeführt, um diese Hypothese zu überprüfen<sup>155</sup> und konnten nachweisen, dass die pathogene AAV Integration hauptsächlich in einem speziellen murinen Genlocus (Rian-Locus, Chromosom 12) stattfand, der analog im Menschen nicht existiert. Des Weiteren konnte die Integration durch Vektordosis sowie Promotorwahl beeinflusst werden. Eine direkte Verbindung zwischen der Entstehung von HCC und der Behandlung mit AAV konnte bisher ausschließlich bei Mäusen nachgewiesen werden, alle klinischen Studien wiesen hingegen exzellente Sicherheitsprotokolle auf<sup>156</sup>. Eine weitere Studie zur Untersuchung von Patienten mit spontan entstandenen HCCs zeigte, dass bei nur ungefähr 6% gleichzeitig auch eine AAV-Integration aufgetreten war<sup>157</sup>. Diese Diskrepanz zwischen der hohen Seroprävalenz und der geringen AAV-bedingten Entstehung von HCCs im Menschen sowie die vielversprechenden Sicherheitsberichte klinischer Studien befürworten demnach weiterhin die Anwendung von AAV Vektoren zur Gentherapie als sicheres Werkzeug. Wildtyp AAVs werden zudem idealerweise bei Präparationen vollständig

eliminiert, um letztlich ausschließlich die rekombinanten AAV Vektoren als Transfersystem zu verwenden, bei denen die für eine Wirtszellinfektion kritischen viralen Sequenzen vollständig entfernt wurden<sup>156</sup>. Dennoch sollten aufgrund dieser neuen Erkenntnisse bezüglich der Pathogenität von AAV einige Aspekte zur Verbesserung der Sicherheit in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise die sorgfältige Promotorwahl im AAV Design sowie der Verzicht einer AAV-Therapie für Patienten mit besonderem Risiko für Lebererkrankungen<sup>156</sup>. Erwähnenswert bezüglich der Sicherheit von AAV ist weiterhin, dass dem Rep-Protein 78 zytotoxische Auswirkungen auf die Wirtszelle nachgewiesen werden konnten. So zeigten beispielsweise Schmidt und Kollegen, dass durch Rep78 Expression eine Aktivierung von Caspase-3 induziert wird, was letztlich unabhängig von p53 zur Apoptose der Wirtszelle führt<sup>158</sup>. Eine jüngere Studie von Berthet *et al.* erläutert die Beteiligung von Rep78 an einem Zellzyklusarrest in der S-Phase durch Ausbildung von Einkerbungen mit daraus folgenden DNA-Schäden in der Wirtszelle, vermittelt über die Serin-Proteinkinase ATM und die Checkpoint-Kinase Chk2<sup>159</sup>. Bei rekombinanten AAV Vektoren ist die virale *rep* Sequenz jedoch vollständig ausgelöscht, weshalb Rep78-vermittelte, zytotoxische Effekte für den Einsatz in der Gentherapie keine Rolle spielen.

### Wirtszellinfektion

Die Wirtszellinfektion (Abb. 11) verläuft hauptsächlich über Bindung an einen viralen Rezeptor, den Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) Rezeptor unter weiterer Einwirkung des (engl.) *Fibroblast Growth Factor Receptor* 1, Integrin  $\alpha 5/\alpha 5\beta 1$  und dem (engl.) *Hepatocyte Growth Factor Receptor* c-Met<sup>149</sup>. Nach Kopplung an die Rezeptoren werden die Partikel via Clathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen und unter Einwirkung der Rab Proteine und anderer zellulärer Faktoren zum Nukleus transportiert<sup>160</sup>. Pillay *et al.*<sup>161</sup> dokumentierten erst kürzlich einen neuen Aufnahmemechanismus über den sogenannten AAV-Rezeptor (AAVR), der über eine direkte Bindung der AAV Partikel zur Endozytose führt und essentiell für eine Wirtszellinfektion ist, dieser Prozess ist jedoch bisher nur wenig erforscht. Die Freisetzung des Virus aus den Endosomen findet noch vor Eindringen in den Zellkern durch Aktivierung der Phospholipase A2 statt<sup>160</sup>. Anschließend werden die Viruspartikel weiter zum Nukleus transportiert und integriert, wobei entweder vor oder direkt nach der Integration die virale DNA aus der Capsidhülle freigesetzt wird (engl.: *Uncoating*)<sup>160</sup>. Der exakten Prozesse sowie die Reihenfolge der Integration und des (engl.) *Uncoatings* sind noch nicht vollständig geklärt<sup>153,162</sup>, Einflüsse durch ein nukleäres Lokalisierungssignal innerhalb der VP2 (engl.: *Virion Protein*) Sequenz sowie eine Stimulation durch Nukleolin wurden jedoch dokumentiert<sup>153,160</sup>. Nach komplementärer Zweitstrangsynthese durch Polymerasen der Wirtszelle schließt sich entweder ein lysogener (ohne Helfervirus) oder ein lytischer Zyklus (bei Vorhandensein eines Helfervirus) an.



**Abb. 11:** Wirtszellinfektion von AAV.

Abbildung modifiziert nach Ding *et al.* 2005<sup>160</sup>.

1. Kopplung der AAV Virions an HSPG Rezeptor und Co-Rezeptoren; 2. Endozytose des gesamten Komplexes; 3. intrazellulärer Transport zum Nukleus; 4. Freisetzung der Virions aus den Endosomen; 5. Eindringen in den Nukleus; 6. Lösen der einzelsträngigen viralen DNA aus der Capsidhülle; 7. Zweitstrangsynthese zur Integration ins Wirtszellgenom (lysogener Zyklus) oder Virusreplikation, Packaging und Virionfreisetzung (lytischer Zyklus). HSPG = Heparansulfat Proteoglykan Rezeptor.

Ohne Anwesenheit eines Helfervirus kann lediglich eine latente, aber stabile Infektion der Wirtszelle auftreten, die zur stillen Integration der AAV Sequenzen in einem bestimmten Lokus von Chromosom 19 des humanen Genoms (engl.: AAV *Integration Site* 1 – AAVS1) sowie zur Ausbildung von stabilen Episomen führt (= lysogener Zyklus<sup>153</sup>), ohne dabei weitere Prozesse innerhalb der Wirtszelle hervorzurufen. Der Mechanismus der AAV-Integration ist komplex und nicht vollständig geklärt, in der Literatur wird jedoch oft ein Substitutionsmodell beschrieben, das von den AAV-ITRs sowie von den Rep-Proteinen 68 und 78 abhängig ist<sup>163-165</sup>. Im Integrationsmodell von Linden *et al.* wird zunächst eine Komplexbildung zwischen AAV und AAVS1 über Rep68/78 beschrieben, wodurch eine Einkerbung im Bereich der AAVS1 Sequenz verursacht und eine Zusammenlagerung von zellulären Replikationsfaktoren stimuliert wird<sup>166</sup>. Anschließend kommt es ausgehend von der Einkerbung zur Synthese eines einzelsträngigen Zwischenprodukts mit zirkulärer Verlagerung in Richtung des abgelösten DNA-Strangs<sup>166</sup>. Die nachfolgende Zweitstrangsynthese erlaubt die Ausbildung einer



Verbindung zwischen den Sequenzen von AAVS1 und AAV im ITR-Bereich<sup>166</sup>. Im letzten Schritt kommt es zur Verlängerung der AAV Sequenz, die ebenfalls zirkulär in Richtung der AAVS1 Sequenz verlagert wird und letztlich zu einer zweiten und somit vollständigen Verbindung der Sequenzen des Virus und der Wirtszelle führt<sup>166</sup>. Sowohl nach chromosomaler Integration als auch nach Ausbildung von stabilen Episomen führt erst die Superinfektion mit einem Helfervirus letztlich zur Exzision der Provirus-DNA aus dem Wirtszellchromosom mit anschließender Replikation und Packaging der viralen DNA, was in der Freisetzung der viralen Nachkommen durch Zelllyse resultiert (= lytischer Zyklus<sup>149</sup>).

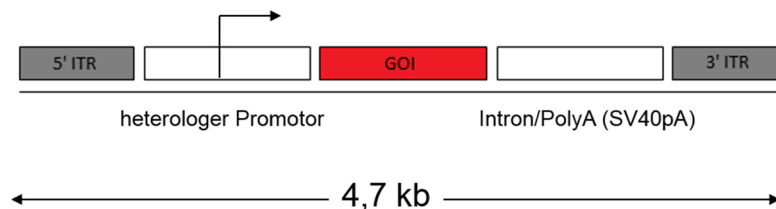
### *DNA Replikation und Packaging*

Die Einleitung der Replikation verläuft unabhängig von der viralen Genexpression durch (engl.) *Self-Priming* der palindromischen Sequenzen der AAV-ITRs am Replikationsursprung, dem sogenannten (engl.) *Rep Binding Element* (RBE)<sup>152</sup>. Durch eine Co-Infektion mit Adenoviren induzieren mehrere adenovirale Gene (hauptsächlich E2a, aber auch E1a, E1b, VA RNA & E4) die Aktivierung der AAV Promotorsequenzen p5 und p19, was schließlich in der Transkription und Translation der Rep Proteine resultiert<sup>151</sup>. Rep78 und Rep68 interagieren schließlich mit RBE und der (engl.) *Terminal Resolution Site* (*trs*, verantwortlich für die Ausbildung der ITR-Haarnadelstruktur) innerhalb der ITRs und sind an der Vervielfältigung des DNA Doppelstrangs beteiligt<sup>149</sup>. AAV selbst besitzen jedoch keine Kodierung für eine Polymerase und sind demnach zur Elongation von einer Polymerase der Wirtszelle abhängig<sup>149</sup>. Rep52 und Rep40 führen schließlich zur Bildung & Akkumulation eines einzelsträngigen viralen Genoms aus den doppelsträngigen replikativen Zwischenprodukten<sup>149</sup>. Das *cap* Gen, translatiert durch Promotor p40, kodiert für die Virion Proteine VP 1, 2 und 3, die sich in relativ kurzer Zeit nach Translation zu leeren Capsiden im Verhältnis 1:1:10 zusammenlagern<sup>149,151</sup>. Die Einkapselung der DNA wird durch Protein-Protein Interaktionen zwischen den Capsiden und Rep78/68-Komplexen mit dem AAV Genom gesteuert<sup>149</sup>. Außerdem findet eine Kopplung der Proteine Rep52 und Rep40 an die Capside statt, was schließlich einen Poretransfer der einzelsträngigen DNA in die leeren Partikel ermöglicht<sup>149</sup>. Die Freisetzung der Virions (AAV und Helfervirus-Anteile) wird letztlich durch Apoptose und Lyse der Wirtszelle als Konsequenz der Adenovirus-Infektion erreicht<sup>149</sup>.

### *Rekombinante AAV Vektoren*

Der Vorteil von rekombinanten AAV (rAAV) Vektoren ist, dass die viralen *rep* und *cap* Sequenzen vollständig durch ein gewünschtes Transgen mit heterologem Promotor und Polyadenylierungssignal ersetzt werden können und nur die ITRs zur weiteren Ermöglichung effektiver Replikation erhalten bleiben<sup>103</sup> (Abb. 12). Durch Löschung der viralen Sequenzen mit daraus folgender fehlender Expression des zytotoxischen Rep78 Proteins sind rAAV

Vektoren weniger toxisch und immunogen, die zusätzliche heterologe Promotorsequenz ermöglicht eine Genexpression unabhängig von Helferviren<sup>15</sup>. rAAV Vektoren sind hocheffizient und bleiben hauptsächlich in Form von stabilen Episomen mit nur geringer Integration ins Wirtszellgenom ( $\sim 10\%^{149}$ ) erhalten, was das Risiko zur Insertionsmutagenese deutlich verringert<sup>15</sup>.



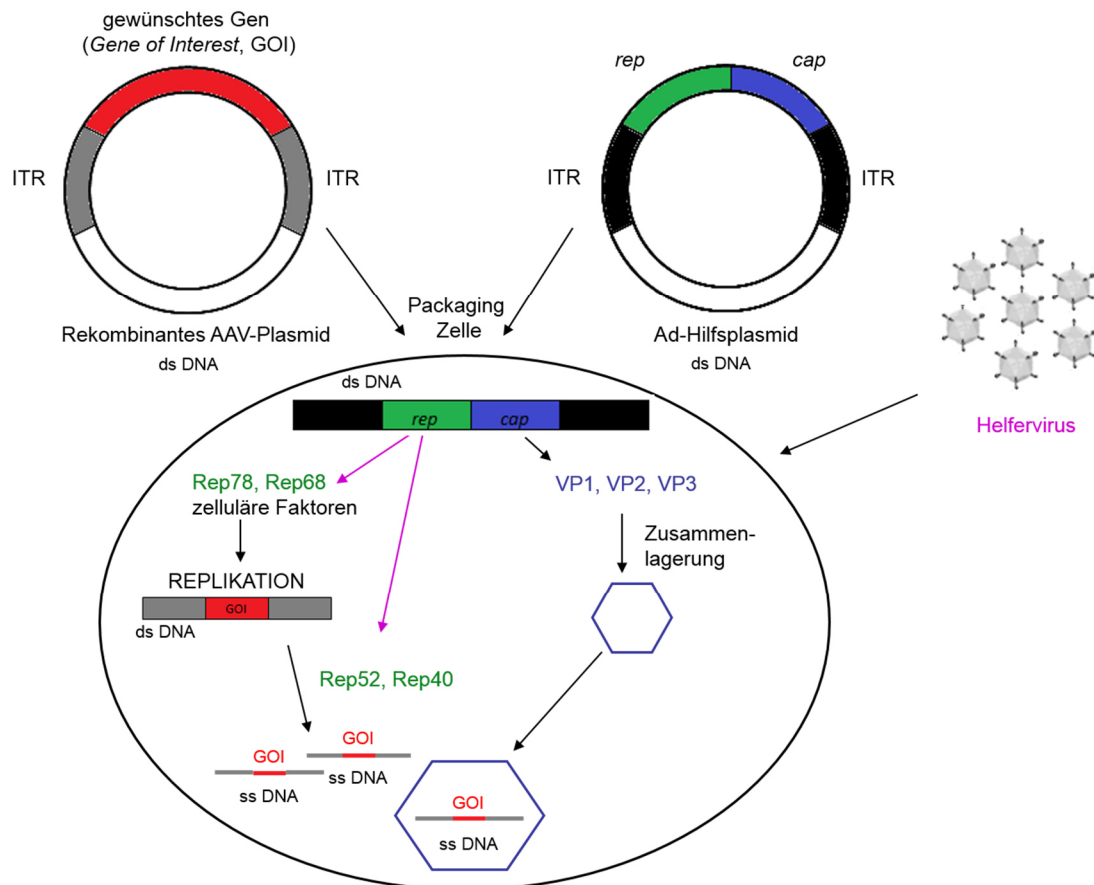
**Abb. 12:** Rekombinantes AAV-2 Genom.

Abbildung modifiziert nach Cucchiari *et al.* 2009<sup>103</sup>.

AAV = Adeno-assoziiertes Virus; ITR = (engl.) *Inverted Terminal Repeat*; GOI = (engl.) *Gene of Interest*; polyA = Polyadenylierungssignal; kb = Kilobasen.

Die Herstellungsmethode solcher rAAV Vektoren (Transfektion) ist komplex. Zunächst muss das rekombinante AAV-Plasmid durch Klonierung der gewünschten cDNA in ein AAV-2 Template hergestellt werden, das dann mittels Transformation in Bakterien eingeschleust, vervielfältigt und später extrahiert wird. Das entstandene rAAV Plasmid besitzt jedoch keine Funktionen zur Replikation und Virionzusammenlagerung, diese müssen zur Produktion der Vektoren durch ein zweites DNA-Konstrukt mitgeliefert werden (Ad Hilfsplasmid). In der vorliegenden Arbeit wurde die Transfektion in HEK-293 Zellen durchgeführt, einer menschlichen embryonalen Nierenzelllinie (Abb. 13).

Die Wirtszelle wird zunächst mit dem Helfervirus (Ad5) und anschließend mit dem rekombinanten AAV-Plasmid (mit GOI Sequenz) in Kombination mit dem Ad-Hilfsplasmid (mit *rep* und *cap* Sequenzen) infiziert. Durch die Ad5 Co-Infektion wird die Proteinsynthese der Rep-Proteine des Hilfsplasmids stimuliert, die gemäß des ursprünglichen Prinzips zur Replikation der AAV-DNA und deren anschließenden Umwandlung in Einzelstränge führen. Durch Synthese der Cap-Proteine des Ad-Hilfsplasmids wird der Einschluss der einzelsträngigen DNA in Capside stimuliert, die Freisetzung der rekombinanten Vektoren findet letztlich durch mechanische Stimulation statt.



**Abb. 13: rAAV Herstellung.**

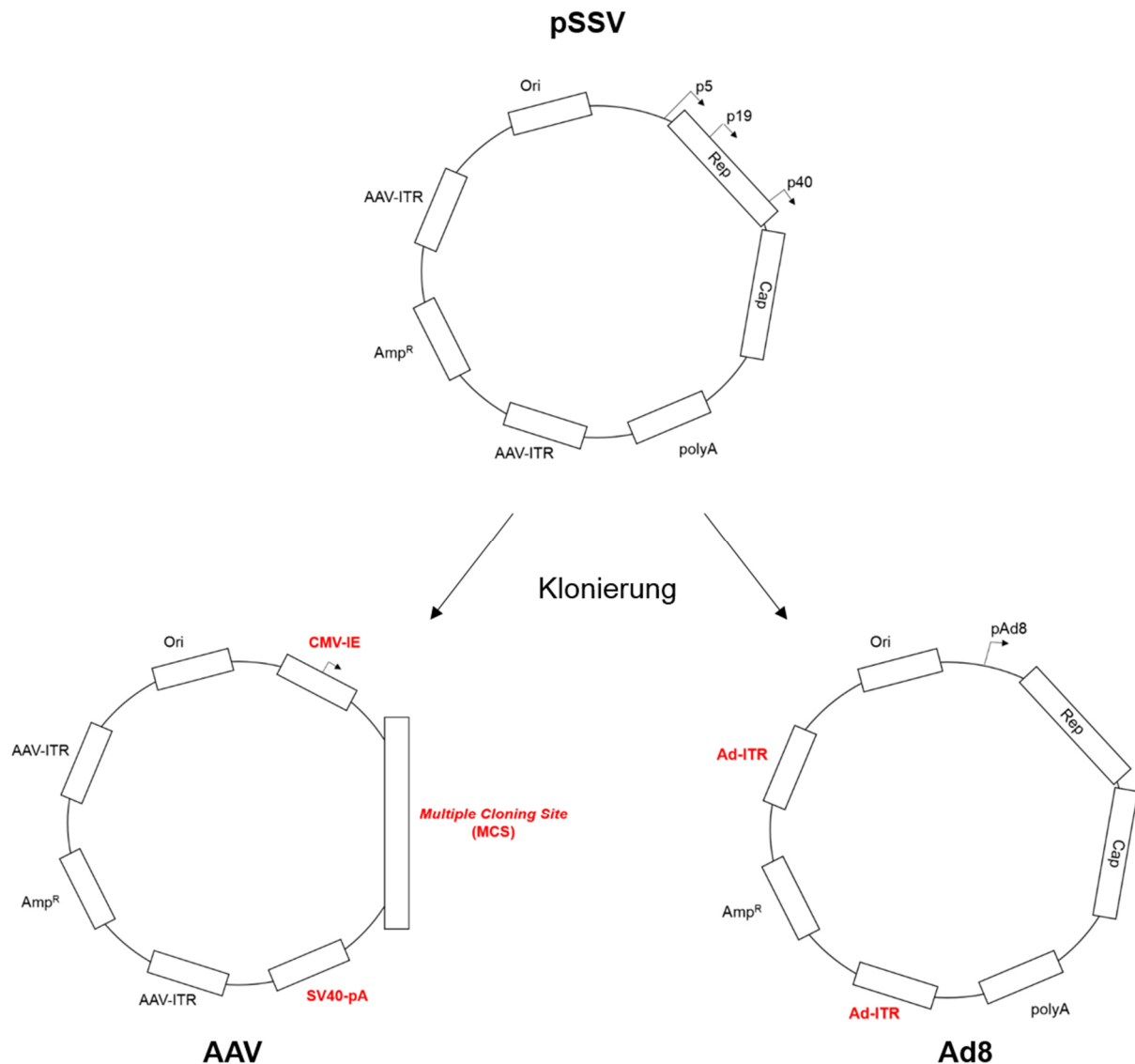
Abbildung modifiziert nach Goncalves 2005<sup>149</sup>.

Ad = Adenovirus; GOI = (engl.) *Gene of Interest*; ITR = (engl.) *Inverted Terminal Repeat*; rep = AAV-Gen für Replikation; cap = AAV-Gen für Capsidbildung; ds = doppelsträngig; ss = einzelsträngig; VP = (engl.) *Virion Protein*.

### Plasmiddesign

Plasmide sind natürlich vorkommende bakterielle DNA-Elemente, die meist extrachromosomal und zirkulär auftreten<sup>167</sup>. Molekulares Klonieren erlaubt den Einschluss gewünschter DNA-Fragmente (eukaryotisch, viral) in solche Plasmide, die dann in Bakterien unabhängig vom Bakterienchromosom amplifiziert werden können<sup>167</sup>. Der Unterschied zur Amplifikation mittels PCR ist hier, dass DNA-Klone deutlich stabiler sind als PCR-Produkte und die Fehleranfälligkeit der Vervielfältigung somit geringer ist<sup>167</sup>. Wie bereits erwähnt wurden zur Herstellung von rAAV Vektoren 2 verschiedene Basis-Plasmide konstruiert: das rAAV Plasmid mit variabler Klonierungsstelle (engl.: *Multiple Cloning Site*, MCS) und ein Ad8 Hilfsplasmid (Abb. 14). Beide stammen vom rekombinanten Plasmid pSSV9, einem AAV-2 genomischen Klon kreiert nach Samulski *et al.* 1987<sup>168,169</sup> auf Basis des pEMBL Pasmids nach Dente *et al.* 1983<sup>170</sup>. Das pSSV9 Plasmid (Abb. 14) beinhaltet das vollständige AAV Genom mit rep und cap inklusive (engl.) *Inverted Terminal Repeat* Enden (AAV-ITRs), Promotorsequenzen und Polyadenylierungssignal (polyA). Ein weiterer wichtiger Bestandteil ist der

Replikationsursprung (Ori), eine Gensequenz, die dem Bakterium die Information gibt, das Plasmid analog zum Bakterienchromosom zu vervielfältigen.



**Abb. 14:** Schematischer Aufbau des Grundplasmids (pSSV9) sowie der beiden Basisplasmide zur Transfektion (AAV und Ad8).

Rekombinante Sequenzen sind in rot dargestellt. Ori = Replikationsursprung; AAV = Adeno-assoziiertes Virus; Ad = Adenovirus; ITR = (engl.) *Inverted Terminal Repeat*; rep = AAV-Gen für Replikation; cap = AAV-Gen für Capsidbildung; Amp<sup>R</sup> = Antibiotikaresistenz; CMV-IE = (engl.) *Cytomegalievirus Immediate Early*; SV40-pA = Simianvirus 40 Polyadenylierung; polyA = Polyadenylierungssignal.

Weiterhin besitzt der Vektor einen Selektionsmarker. Hierbei handelt es sich um eine Antibiotika-Resistenz ( $\beta$ -Lactamase-Gen, Amp<sup>R</sup>), welche ausschließlich Bakterien mit eingeschlossenem Vektor das Wachstum auf Ampicillin-behandeltem Medium/Agar erlaubt. Im Hilfsplasmid Ad8 wurden die AAV-ITRs durch Adenovirus-ITRs (Ad-ITRs) als trans-wirkende Elemente mit starkem, aber nicht toxischem Promotor (pAd8) ersetzt, um homologe

Rekombination und Wildtyp-AAV Produktion im späteren Transfektionsprozess zu vermeiden. Im rAAV Plasmid hingegen bleiben die AAV-ITRs als cis-wirkende Elemente erhalten. Zur Erhöhung der Translatierbarkeit und Stabilität der mRNA im Prozess der Proteinbiosynthese wurde eine Polyadenylierung des Simian Virus 40 (SV40-pA) eingefügt. Ein heterologer Promotor (engl.: *Cytomegalievirus Immediate Early*; CMV-IE) dient der Transkription des Zielgens innerhalb der Wirtszelle zum gewünschten Zeitpunkt und die (engl.) *Multiple Cloning Site* (MCS) repräsentiert die Klonierungsstelle für das Zielgen. Diese besitzt etliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die nur einmal innerhalb des Plasmids vorkommen und demnach die abschließende Integration der gewünschten Gensequenzen mittels Subklonierung ermöglichen. Im Rahmen dieser werden sowohl der AAV Vektor als auch die gewünschten cDNA-Sequenzen durch ein spezielles Primerdesign vorbehandelt. Hierbei werden mittels PCR Nukleotide an die Sequenzen angehängt, die Schnittstellen für die ausgewählten Restriktionsenzyme beinhalten. Die erhaltenen Sequenzen werden dann mit diesen Enzymen zersetzt, wodurch sogenannte (engl.) *Sticky Ends* am Ende der DNA-Abschnitte entstehen, die letztendlich zur Verbindung der Zielsequenz mit dem AAV-Vektor dienen (= Ligation)<sup>168,171</sup>.

#### *rAAV-vermittelter Gentransfer*

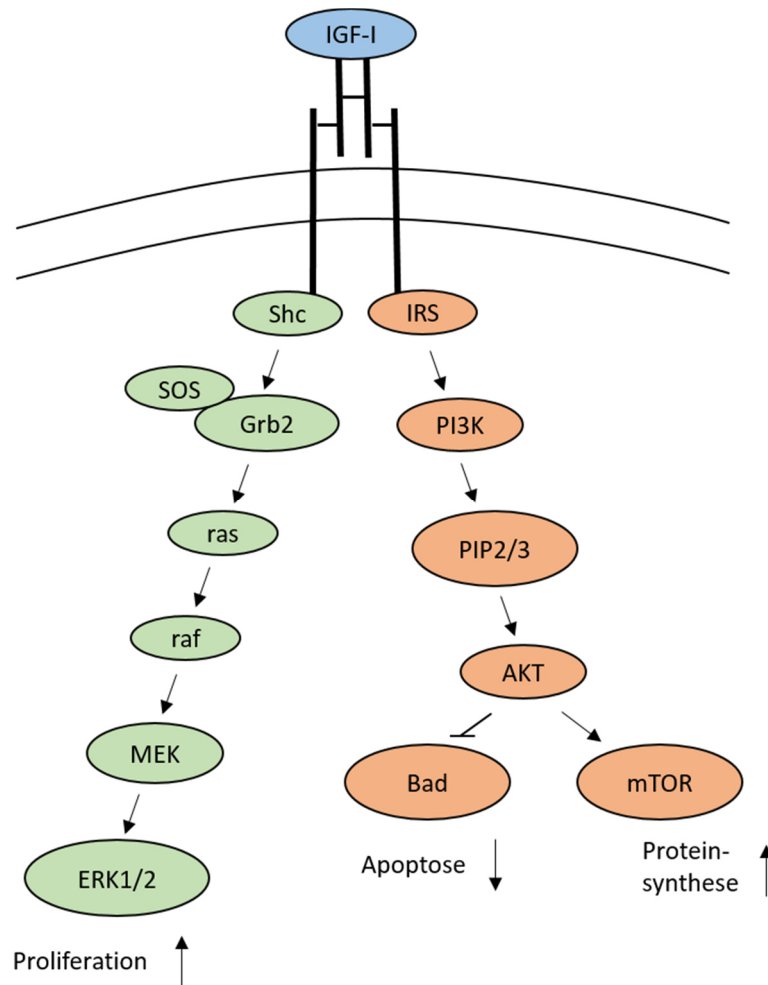
Die Aufnahme der rAAV Vektoren von den Zielzellen erfolgt grundsätzlich nach dem Prinzip der Wirtszellinfektion des Wildtyp-Virus: nach Rezeptorbindung werden die Partikel mittels Endozytose aufgenommen und zum Nukleus transportiert, begleitet von endosomaler Freisetzung und (engl.) *Uncoating* der viralen DNA (siehe Kapitel *Wirtszellinfektion*). Nach Eindringen in den Zellkern und Zweitstrangsynthese kommt es hauptsächlich zur Ausbildung von doppelsträngigen, zirkulären Episomen<sup>4,172</sup>, die letztlich zur Transgenexpression innerhalb der Wirtszelle führen<sup>4</sup> (= lysogener Zyklus). Aufgrund des heterologen Promotors ist eine Abhängigkeit von Helferviren nicht mehr gegeben.

#### *Insulinartiger Wachstumsfaktor I*

Der Insulinartige Wachstumsfaktor I (engl.: *Insulin-like Growth Factor I* - IGF-I), auch bekannt als Somatomedin C, ist ein wichtiger fetaler sowie postnataler Wachstumsfaktor, der durch Regulation von Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen an Entwicklung und Wachstum verschiedener Organe und Geweben beteiligt ist<sup>173</sup>. Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich über den IGF-I Rezeptor (IGF-IR), der aus zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten und 2 transmembranen  $\beta$ -Untereinheiten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind<sup>173</sup>. Nach Ligandenbindung an die  $\alpha$ -Untereinheiten wird eine Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheiten induziert, was letztlich in der vollständigen Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase des Rezeptors resultiert. Es wird zwischen 2 unterschiedlichen Signalwegen

unterschieden, dem Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B Signalweg (PI3K/Akt) und dem *ras-raf*-MEK-ERK Signalweg (*ras/raf* = Proto-Onkogene, MEK = (engl.) *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*, ERK = (engl.) *Extracellular Signal-related Kinase*) (Abb. 15). Der PI3K Signalweg startet über die Bindung des Insulin-Rezeptor-Substrats (IRS) an den IGF-IR, das im Folgenden PI3K über dessen regulatorische Untereinheit rekrutiert und diese anschließend phosphoryliert, was wiederum in der Phosphorylierung von Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP<sub>3</sub>) in der Zellmembran und in der daraus folgenden Rekrutierung und Aktivierung von Akt resultiert<sup>174</sup>. Das aktivierte Akt führt zur Inaktivierung von Bad, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, wodurch die Zellapoptose verhindert wird<sup>174</sup>. Zusätzlich wird von Akt auch eine Aktivierung von mTOR (engl.: *Mechanistic Target of Rapamycin*) sowie eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin induziert, was im Folgenden die Proteinsynthese sowie Zellproliferation stimuliert<sup>174</sup>. Der *ras-raf*-MEK-ERK Signalweg startet über die Phosphorylierung von Shc (engl.: *Src Homology and Collagen Protein*) nach Ligandenbindung, was daraufhin zur Rekrutierung von Grb2 (engl.: *Growth Factor Receptor-bound Protein*) mit anschließender Komplexbildung mit SOS (GTP-Austauschfaktor) führt<sup>174</sup>. Es folgt ein GDP/GTP Austausch in *ras*, was zu seiner Aktivierung führt und im Folgenden wiederum *raf* aktiviert, wodurch MEK phosphoryliert und schließlich ERK1/2 aktiviert wird. Aktiviertes ERK kann in den Nukleus eindringen, wo es zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren beiträgt, die zur gesteigerten Expression von Cyclin D1 und der daraus folgenden Stimulation der Proliferation führt<sup>174</sup>. Zusätzlich zu den aufgeführten Signalwegen kann die Ligandenbindung an den IGF-IR durch Aktivierung von p38<sup>175</sup> und (engl.) *c-terminal jun N-terminal Kinase* (JNK)<sup>175</sup> noch 2 weitere Signalwege einleiten, die jedoch bisher noch nicht vollständig aufgeklärt wurden<sup>173</sup>.

Eine wichtige Rolle für die Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit und Verteilung von IGF-I spielen die sogenannten IGF-bindenden Proteine (engl.: *IGF Binding Proteins* – IGFBPs)<sup>174</sup>. Es existieren 6 unterschiedliche IGFBPs, die durch ihre Bindung an IGF-I sowohl zur Verstärkung als auch zur Hemmung der durch IGF-I hervorgerufenen Effekte führen können. Die Art der Auswirkung einer IGFBP Kopplung ist dabei von unterschiedlichen Faktoren abhängig, wie beispielsweise der Art des IGFBPs (1 – 6), dem molaren Verhältnis zu IGF-I, dem Zelltyp und dem Differenzierungslevel der beteiligten Zellen sowie einer Einwirkung von Matrixmolekülen, posttranskriptionalen Modifikationen und proteolytischer Prozessierung<sup>174</sup>.



**Abb. 15:** Hauptachsen des IGF-I Signalwegs.

Abbildung modifiziert nach Bikle & Wang 2011<sup>174</sup> und Gallagher *et al.* 2010<sup>176</sup>.

IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, PIP = Phosphatidylinositolphosphat, Akt = Proteinkinase B, Bad = pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, mTor = (engl.) *Mechanistic Target of Rapamycin*, Shc = (engl.) *Src Homology and Collagen Protein*, SOS = GTP-Austauschfaktor, Grb = (engl.) *Growth Factor Receptor-bound Protein*, ras/raf = Proto-Onkogene, MEK = (engl.) *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*, ERK = (engl.) *Extracellular Signal-related Kinase*.

Im Gelenkknorpel stellt IGF-I einen der wichtigsten anabolen Wachstumsfaktoren dar, der für Knorpel-Homöostase sowie die Synthese und Degradation von Proteoglykanen durch die Chondrozyten zuständig ist<sup>177</sup>. IGF-IR Knockoutstudien zeigten, dass IGF-I in der Epiphysenfuge die chondrogene Differenzierung von MSZ entweder direkt durch Stimulation von Zellproliferation und -reifung sowie Regulation von terminaler Differenzierung und Apoptose<sup>95,177,178</sup>, oder indirekt durch Inhibition der Expression des (engl.) *Parathyroid Hormone-related Protein* (PTHrP) fördert<sup>178</sup>. PTHrP wirkt über den PTH/PTHrP Rezeptor in proliferierenden Chondrozyten und stimuliert die Proliferation, während die vollständige Reifung jedoch verzögert wird<sup>178</sup>. Die PTHrP Inhibition kann hierbei entweder durch direkten Einfluss von IGF-I auf PTHrP-exprimierende Zellen zurückzuführen sein, oder aber auf einen

indirekten Effekt auf das Signalmolekül (engl.) *Indian Hedgehog* (IHH), das die PTHrP-Expression im Rahmen einer negativen Rückkopplungsschleife stimulieren kann<sup>178</sup>. IGF-I ist jedoch nicht nur ein potenter Regulator der chondrogenen Differenzierung von Knorpelvorläuferzellen, dem Wachstumsfaktor wird auch eine bedeutende Rolle bei der Knochenbildung zugesprochen. So beschrieben beispielsweise Wang *et al.*, dass durch den IGF-I Signalweg die Proliferation, das Überleben sowie die Differenzierung von MSZ zu Osteoblasten und Osteozyten stimuliert werden<sup>178</sup>. Dieser Effekt kann erneut entweder direkt durch Einwirkung auf Vorläuferzellen der osteogenen Differenzierungslinie hervorgerufen werden, oder indirekt durch eine Verstärkung von Zell-Zell Interaktionen zwischen Osteoblasten und aus hämatopoetischen Stammzellen differenzierten Osteoklasten durch Stimulation spezifischer Signalwege<sup>178</sup>. Von großer Bedeutung ist auch der Einfluss von IGF-I auf die adipogene Differenzierung von MSZ, beispielsweise durch die Stimulation der Zellteilung von adipogenen Vorläuferzellen<sup>179,180</sup> oder durch Rezeptorphosphorylierung infolge der Aktivierung von (engl.) *Advanced Glycation End Products* (AGEs) mit nachfolgender Induktion des PI3K-Akt Signalwegs in prä-adipogenen Zellen<sup>179,181</sup>.

Der Gentransfer von IGF-I in MSZ wurde bisher hauptsächlich mit nichtviralen Methoden durchgeführt<sup>182</sup> oder mit Hilfe von adenoviralen Vektoren<sup>183,184</sup>, wobei IGF-I nur in Kombination mit zusätzlichen chondroreparativen Faktoren tatsächlich zur Stimulation der chondrogenen Differenzierung fähig war. In Knochenmarkaspiraten wurde ein IGF-I Gentransfer in keiner Studie dokumentiert.

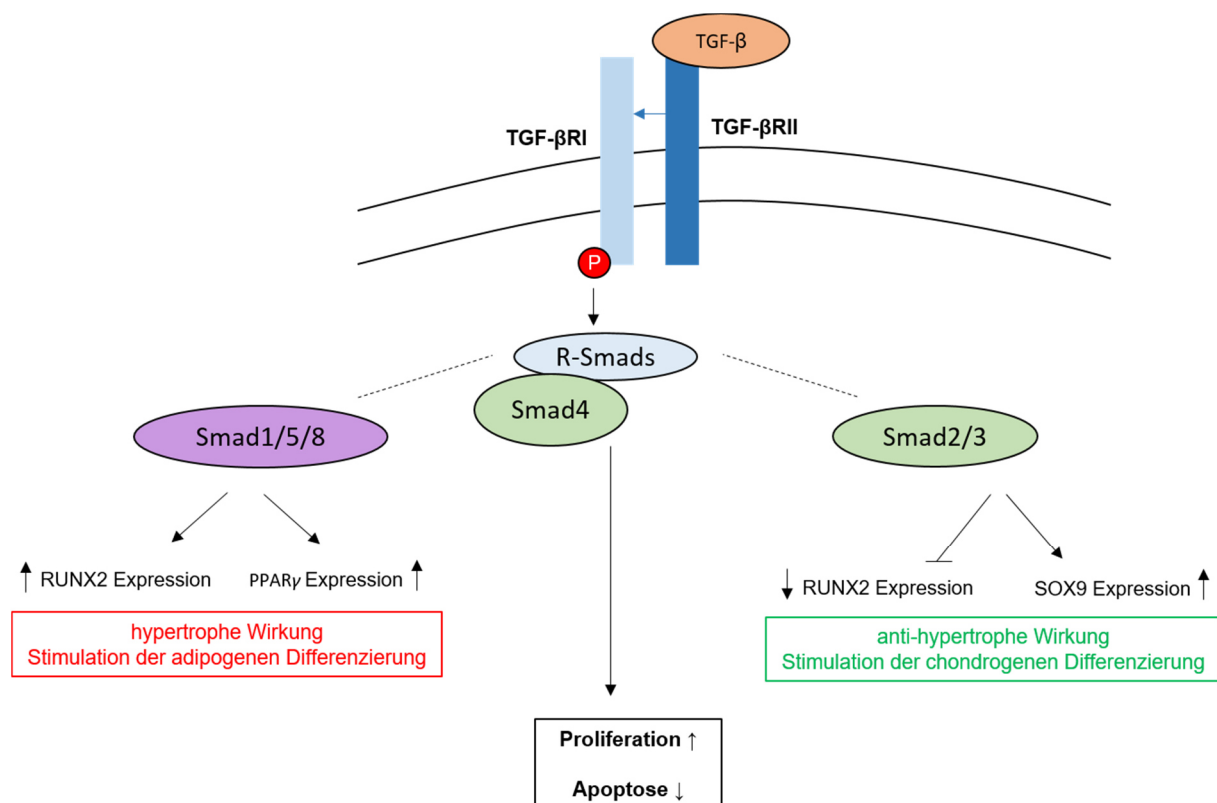
Zusammenfassend stellt IGF-I durch seine unterstützende Rolle bei der Chondrogenese sowie der bisher erhaltenen Forschungsergebnisse bezüglich der chondrogenen Differenzierung in MSZ einen vielversprechenden Faktor im Bereich der Gentherapie zur Knorpelforschung dar. Aufgrund der multipotenten Eigenschaften von MSZ sowie der genannten Effekte von IGF-I auf die adipogene und osteogene Differenzierungslinie ist eine Untersuchung der (Neben-) Effekte auf Hypertrophie und terminale Differenzierung sowie Osteogenese und Adipogenese jedoch unabdingbar. Die Untersuchung des Gentransfers mit IGF-I unter den in der vorliegenden Arbeit angewendeten Bedingungen wurde zuvor noch nie durchgeführt und bietet somit eine wichtige Alternative sowie einen genaueren Einblick in die biologischen Prozesse, die den Effekten der Gentherapie zugrunde liegen.

### Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$

Die Superfamilie des Transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  (engl.: *Transforming Growth Factor  $\beta$*  - TGF- $\beta$ ) besteht aus Zytokinen, deren Mitglieder eine wichtige Rolle innerhalb der



Entwicklung spielen, aber auch mit Gewebsreparatur sowie verschiedenen Krankheiten assoziiert werden<sup>185</sup>. Die Familie beinhaltet 2 Unterklassen, die TGF- $\beta$ s und die (engl.) *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs)<sup>186</sup>. Die 3 Isoformen der TGF- $\beta$ s, die bei Säugetieren nachgewiesen wurden (TGF- $\beta$  1, 2, und 3), werden von spezifischen Genen reguliert und weisen überlappende räumliche und zeitliche Expressionsmuster auf<sup>185</sup>. TGF- $\beta$ 1 ist der Prototyp der 3 Isoformen und spielt sowohl qualitativ als auch quantitativ die wohl wichtigste Rolle<sup>185</sup>. Generell sind die biologischen Effekte von TGF- $\beta$  abhängig vom aufnehmenden Zelltyp und beinhalten die Stimulation von Zellproliferation, Hypertrophie und Differenzierung<sup>185</sup>. Die Aufnahme von TGF- $\beta$  erfolgt über die Bindung an einen Rezeptorkomplex an der Zelloberfläche, bestehend aus Serin/Threonin-Kinase Typ-I und Typ-II Rezeptoren<sup>186</sup> (Abb. 16).



**Abb. 16:** Hauptachsen des TGF- $\beta$  Signalwegs mit Darstellung der beiden wichtigsten Teilachsen.

Smad = (engl.) *Sma and Mad Related Family*, RUNX2 = (engl.) *Runt-related Transcription Factor 2*, SOX9 = (engl.) *SRY [Sex-determining Region Y]-related HMG [High-Mobility Group] Box 9*.

Durch Bindung an den Typ-II Rezeptor wird dieser aktiviert, was zur Phosphorylierung des Typ-I Rezeptors führt, der dann wiederum seine Signale hauptsächlich via Phosphorylierung von R-Smads (R = Rezeptor-abhängig, Smad = (engl.) *Sma and Mad Related Family*) weiterleitet<sup>185,186</sup>. Die phosphorylierten Smads bilden schließlich einen Komplex mit Smad4, der nach Translokation zum Nukleus dort durch Kooperation mit der DNA und DNA-bindenden

Proteinen eine Aktivierung von Zielgenen induziert<sup>185</sup>. Alternativ kann durch Rezeptorbindung auch eine Aktivierung von MAPK (engl.: *Mitogen-activated Protein Kinase*) induziert werden, wodurch dann eine Signaltransduktion auf 3 verschiedenen Wegen hervorgerufen werden kann (über (engl.) *Extracellular Signal-related Kinases* (ERKs), (engl.) *c-Jun-NH2-terminal Kinases* (JNKs) und p38-MAPKs<sup>177</sup>). Diese Signalwege werden jedoch nur zu einem geringeren Anteil aktiviert und sind bisher nur wenig erforscht.

TGF- $\beta$  spielt bei der natürlichen Entstehung von Knorpel durch Regulierung der chondrogenen Differenzierung von Stammzellen eine wichtige Rolle<sup>95,186</sup>. Der Wachstumsfaktor unterstützt hierbei hauptsächlich die mesenchymale Kondensation der frühen Chondrogenese durch Smad3 Aktivierung, aber auch die Proliferation von differenzierten Chondrozyten durch Aktivierung von  $\beta$ -Catenin Signalwegen<sup>95,187</sup>. Die Signaltransduktion über Smad3 resultiert in der Transkription von SOX9 und Typ-II Kollagen, die beide eine überaus wichtige Rolle während der frühen Chondrogenese spielen<sup>95,187</sup> (Abb. 16). TGF- $\beta$  konnte bereits in mehreren *in vitro*<sup>183,184,188-191</sup> und *in vivo*<sup>192-194</sup> Studien erfolgreich zur Induktion der chondrogenen Differenzierung mit daraus folgender Verbesserung der Knorpelreparatur eingesetzt werden, bisher ist allerdings nur wenig über die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Effekte bekannt. Bei den bisher veröffentlichten Studien zur genetischen Manipulation von MSZ mit TGF- $\beta$  via rAAV Vektoren handelt es sich meist lediglich um die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Transgenexpression<sup>195</sup> oder um Untersuchungen bezüglich der Bildung von Matrixkomponenten mit Zellen hoher Passage (P35)<sup>194</sup> oder im Kurzzeitexperiment primärer Kulturen<sup>196</sup>. Über die genetische Manipulation von Knochenmark mit TGF- $\beta$  wurde bisher nur eine Studie von Ivkovic *et al.*<sup>146</sup> veröffentlicht, die adenoviral transduzierte Aspirate in fokale Knorpeldefekte von Schafen implantierten. Eine genaue Analyse der Signalwege wurde jedoch auch in dieser Studie nicht durchgeführt.

Neben der Stimulation der Chondrogenese wurde dokumentiert, dass TGF- $\beta$  auch auf den Prozess der Hypertrophie und terminalen Differenzierung als Übergang zur Osteogenese von MSZ Einfluss nehmen kann, wobei die Auswirkungen von der Art der aktivierten R-Smads abhängig sind (Abb. 16). So kann beispielsweise eine Smad1/5/8-Aktivierung durch Regulation der RUNX2-Expression pro-hypertrophe Effekte mit sich bringen, wohingegen Smad2/3 durch epigenetische Regulation zur Stabilisierung von SOX9 und Inhibierung von RUNX2 führt und somit anti-hypertroph wirkt<sup>9,101</sup> (Abb. 16). Bezüglich der adipogenen Differenzierung von MSZ wurde bisher hauptsächlich eine Stimulation durch den zweiten Hauptvertreter der TGF- $\beta$  Superfamilie, den BMPs, dokumentiert<sup>179</sup>. Durch BMP-induzierte Aktivierung von Smad1/5/8 sowie dem MAPK Signalweg wird die Expression des Transkriptionsfaktors (engl.) *Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) angeregt, dem Hauptregulator der MSZ

Adipogenese<sup>179,197</sup>. Eine Beteiligung von TGF- $\beta$  am Prozess der adipogenen Differenzierung von MSZ ist jedoch aufgrund der Überlappung der BMP und TGF- $\beta$  Signalwege (Smad1/5/8, MAPK) nicht ausgeschlossen und wurde auch bereits in MSZ Pelletkulturen nach adenoviralem TGF- $\beta$  Gentransfer nachgewiesen<sup>135</sup>.

TGF- $\beta$  repräsentiert somit einen zweiten wichtigen Kandidaten für eine Anwendung im Bereich der Knorpelreparatur, dessen Gentransfer unter den hier angewendeten Bedingungen bisher nicht getestet wurde. Auch hier muss beachtet werden, dass ein TGF- $\beta$  Gentransfer Effekte der Hypertrophie, Adipogenese und Osteogenese mit sich bringen kann.

#### 1.4. Hypothesen und Studiendesign

Folgende Hypothesen galt es innerhalb der vorliegenden Promotionsarbeit zu überprüfen und allgemein zu diskutieren:

1. Die Überexpression der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$  via rAAV Vektoren stimuliert die chondrogenen Differenzierungseigenschaften von aus Knochenmark isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen. (Publikation I – II)
2. Die genetische Manipulation von vollständigen Knochenmarkaspiraten stellt eine Vereinfachung des Prozesses dar und liefert vergleichbare Effekte bezüglich der Stimulation der chondroreparativen Eigenschaften. (Publikation III – IV)

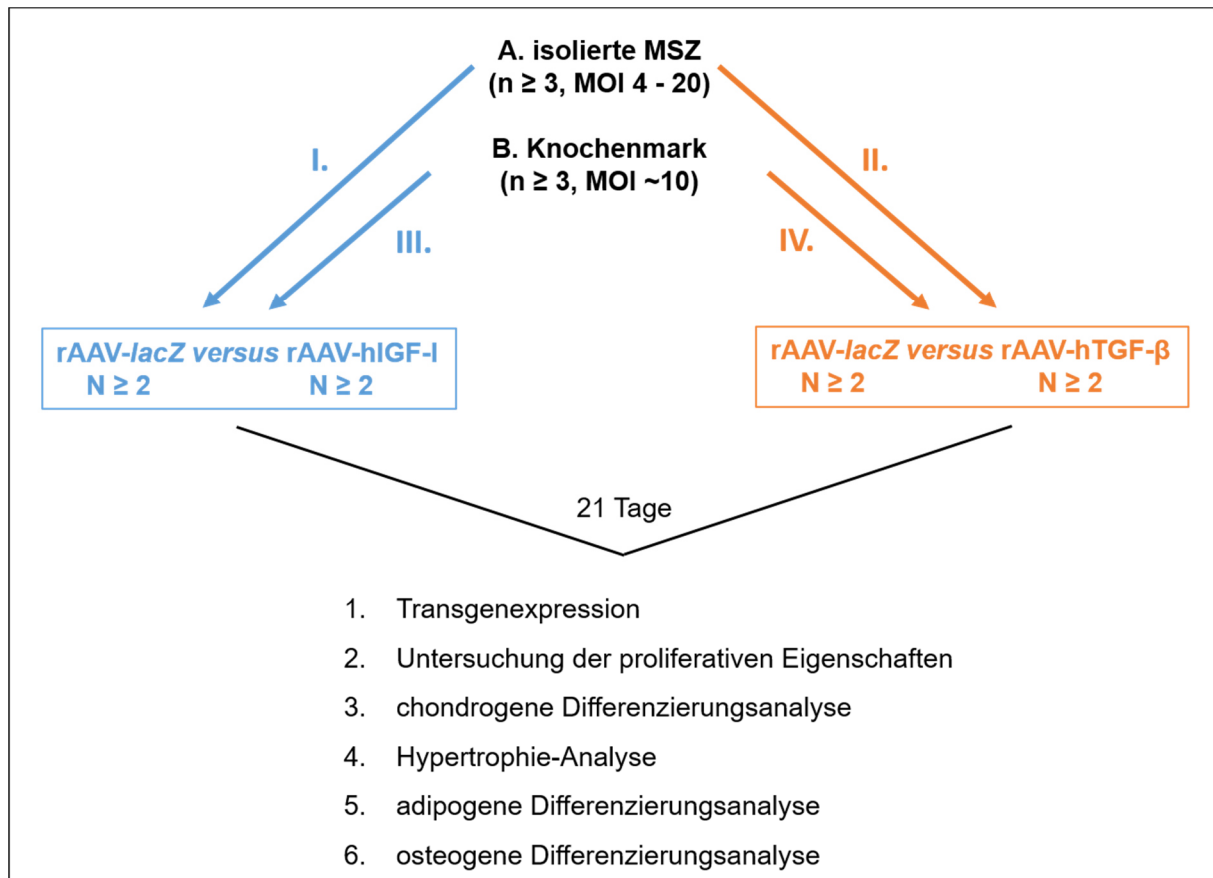
#### Internes Interpretationsziel

Zur Interpretation der erhaltenen Ergebnisse im Rahmen der eingeschlossenen Studien wurde ein interner Vergleich mit Präferenzbestimmung sowohl zwischen isolierten MSZ und Knochenmarkaspiraten als auch zwischen IGF-I und TGF- $\beta$  als Interpretationsziel gesetzt.

#### Studiendesign

Die Eignung von rAAV Vektoren zur Transduktion von MSZ und Knochenmarkaspiraten ohne zytotoxische oder schädliche Effekte sowie ohne Beeinflussung der proliferativen und metabolischen Eigenschaften wurde bereits in früheren Studien bewiesen<sup>85,129,148,194,198</sup>. Demnach wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Analyse und den Vergleich mit untransduzierten Proben verzichtet. Für beide verwendeten Probentypen wurde stattdessen bei allen Analysen (4 Testansätze) für je mindestens 3 Patienten ( $n \geq 3$ ) ein Vergleich zwischen rAAV-*lacZ* und den therapeutischen Genen rAAV-hIGF-I oder rAAV-hTGF- $\beta$  gezogen (Abb. 17). rAAV-*lacZ* beinhaltet das *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) Gen (*LacZ*) und wurde in der

vorliegenden Arbeit als interne Kontrolle und Reportergen verwendet. Der Reportergennachweis wurde hierbei mit Hilfe einer speziellen Färbelösung (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid, X-Gal) durchgeführt, wobei bei Vorhandensein des Enzyms durch Hydrolyse eine Farbänderung von gelb zu indigoblau entsteht<sup>199</sup>. Jede Transduktion wurde mit zuvor optimierten Infektionsmultiplizitäten (engl.: *Multiplicity of Infection* - MOI) durchgeführt und mindestens in Doppelbestimmung getestet.



**Abb. 17:** Studiendesign.

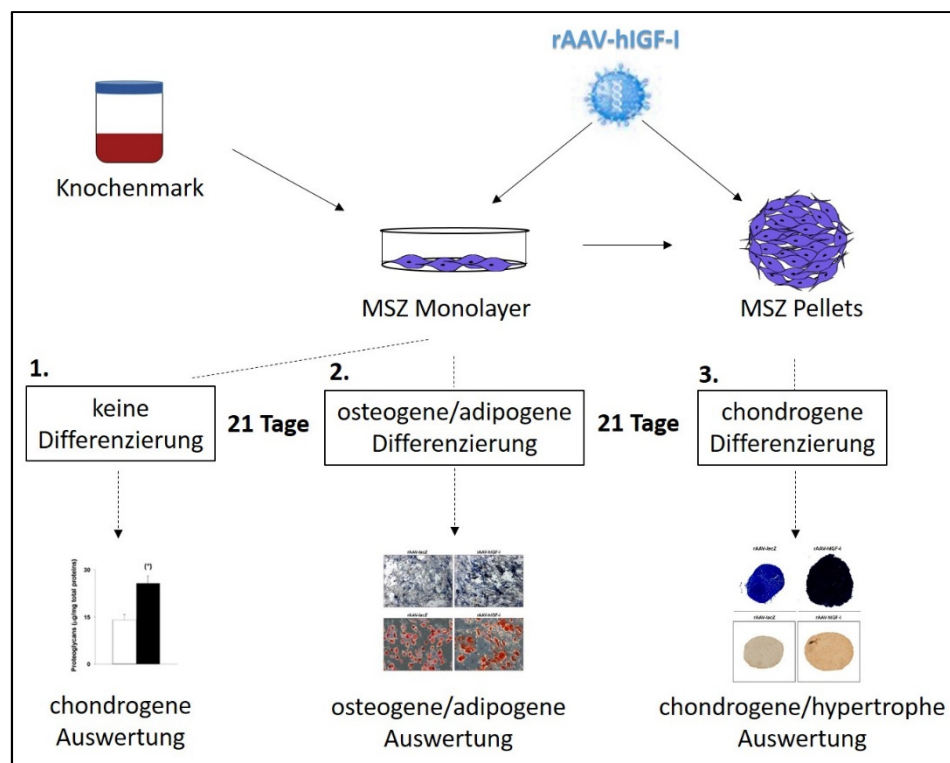
n = Anzahl der Patienten; N = Anzahl der Wiederholungen pro Transduktion; MSZ = Mesenchymale Stammzelle; rAAV = rekombinanter adeno-assoziiierter viraler Vektor; MOI = (engl.) *Multiplicity of Infection*; IGF-I = (engl.) *Insulin-like Growth Factor I*; TGF- $\beta$  = (engl.) *Transforming Growth Factor  $\beta$* .

## 2. Darstellung der einzelnen Publikationen

### I. rAAV-vermittelte Überexpression von IGF-I in humanen, aus Knochenmark isolierten MSZ

Diese Arbeit wurde publiziert als:

**Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M.** Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 2014; 5(4):103; IF 4,634.



**Abb. 18:** Graphische Zusammenfassung der Publikation I.

MSZ = Mesenchymale Stammzelle.

### **Zusammenfassung:**

Die Transplantation von genetisch veränderten Vorläuferzellen wie beispielsweise aus Knochenmark isolierten MSZ ist ein attraktiver Ansatz, um die natürlichen Heilungskapazitäten von Gelenkknorpeldefekten zu verbessern. Von großer Bedeutung ist hierbei die genetische Veränderung mit Wachstumsfaktoren, da ein großer Anteil hiervon am chondrogenen Differenzierungsprozess von MSZ beteiligt ist. In dieser Arbeit wurden die potentiellen Vorteile

einer Überexpression des mitogenen und pro-anabolen Wachstumsfaktors IGF-I auf die biologischen Eigenschaften sowie das Differenzierungspotential von humanen MSZ überprüft.

Humanes Knochenmark wurde von Patienten zur Verfügung gestellt, die einer vollständigen Knie-Arthroplastik unterzogen wurden, die Isolation der Stammzellen erfolgte unmittelbar nach Knochenmarkentnahme gemäß Routineprotokollen<sup>85,129</sup>. Bei geeigneter Zelldichte wurden die MSZ entweder für Versuche in Monolayerkulturen oder in Form von 3D Pelletkulturen aus  $2 \times 10^5$  Zellen weiterverwendet. Mittels rekombinanter adeno-assoziiierter viraler (rAAV) Vektoren wurden die MSZ mit IGF-I *versus* LacZ transduziert und für 21 Tage in verschiedenen Medien kultiviert. rAAV-hIGF-I trägt ein humanes, 536 bp großes cDNA-Fragment und rAAV-lacZ das *E.coli*  $\beta$ -Galactosidase Gen (*LacZ*), das für alle Versuche als Reportergen und Kontrolle diente. Beide Vektoren stehen unter Kontrolle des CMV-IE Promotors/Enhancers und die Herstellung, Aufreinigung und Titration wurden nach Routineprotokollen durchgeführt<sup>85,129,200</sup>. Die Untersuchung der biologischen und chondrogenen Eigenschaften der Proben erfolgte nach Beendigung der Kultivierungsperiode mittels Immunzyto-/Immunhistochemie, biochemischer Assays sowie real-time RT-PCR Analysen. Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Analyse undifferenzierter MSZ in Form von Monolayerkulturen (1 – MOI 20), chondrogen differenzierten 3D Pelletkulturen (3 – MOI 4) sowie adipogen und osteogen differenzierten Monolayerkulturen zur Überprüfung der Effekte auf weitere Differenzierungsvorgänge (2 –MOI 8). Der Fokus lag hierbei auf den Untersuchungen der Pelletkulturen als anerkanntes Modell zur Untersuchung der chondrogenen Eigenschaften von MSZ, da die dreidimensionale Umgebung wichtige Zell-Zell-Interaktionen erlaubt, die vergleichbar mit der Zellkondensationsphase innerhalb der embryonalen Knorpelentwicklung sind<sup>201</sup>.

Signifikant erhöhte und anhaltende Transgenexpression konnte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (*LacZ*) sowohl in undifferenzierten MSZ (1) als auch in chondrogen differenzierten Pelletkulturen (3) nachgewiesen werden. Die gemessenen IGF-I Produktionslevel wiesen dabei eine gute Übereinstimmung mit zuvor durchgeführten Versuchen auf, bei denen ein Gentransfer mit gleichem Vektor (rAAV-hIGF-I) in Chondrozyten<sup>200</sup> oder mit anderen rAAV-Vektoren im gleichen Zelltyp (MSZ) untersucht wurde<sup>129,194,198</sup>. Auch die proliferativen Eigenschaften wurden infolge der IGF-I Überexpression für beide Ansätze (1, 3) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erhöht, nachgewiesen beispielsweise durch Steigerung von DNA-Gehalt, Zelldichte sowie Größe (Durchmesser) der Pelletkulturen und in guter Übereinstimmung mit den proliferativen Eigenschaften des Wachstumsfaktors<sup>202</sup>. Die Hauptuntersuchungen der 3D Pelletkulturen lieferten den Nachweis einer signifikanten Erhöhung spezieller chondrogener Matrixbestandteile (Proteoglykane, Typ-II Kollagen) sowie

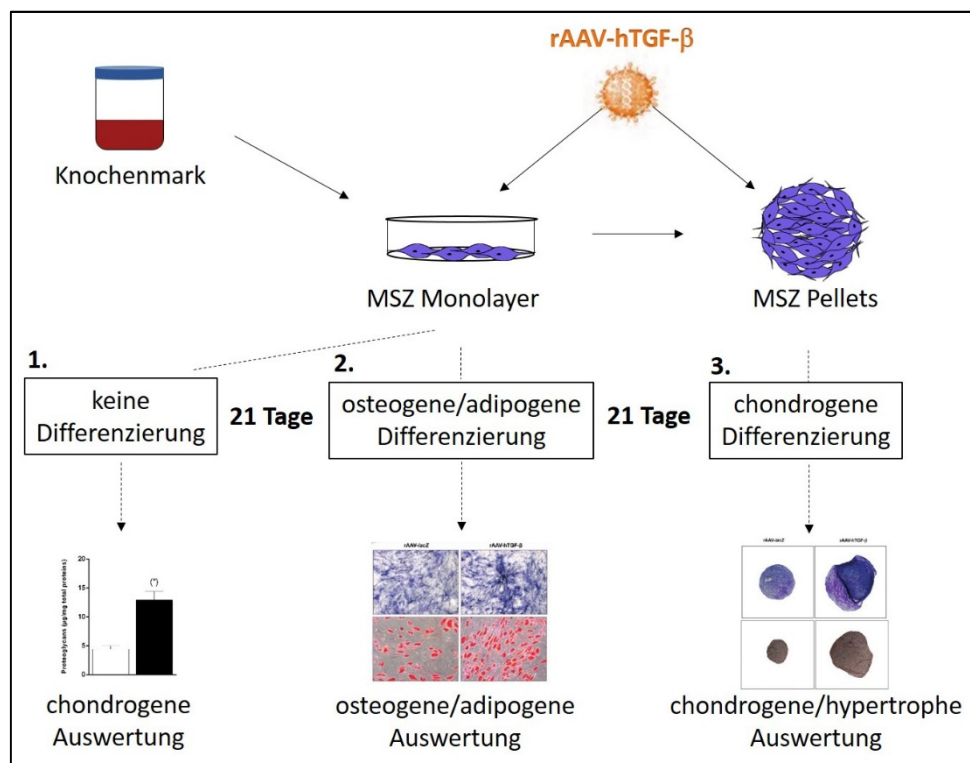
der Expressionslevel von SOX9 als Schlüsselkomponente der chondrogenen Differenzierung von MSZ<sup>95</sup>, wodurch die Hypothese der Stimulation der chondrogenen Eigenschaften durch IGF-I Überexpression deutlich bestätigt wurde. Interessanterweise konnten jedoch auch Hypertrophieeffekte in den mit IGF-I transduzierten Pelletkulturen nachgewiesen werden (Matrix Kalzifizierung, Anstieg von Typ-I und Typ-X Kollagen) und auch die osteogene Differenzierung in Monolayerkulturen (2) wurde infolge der IGF-I Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen stimuliert. Verantwortlich hierfür ist höchstwahrscheinlich der zusätzlich nachgewiesene, durch den Gentransfer induzierte Expressionsanstieg bestimmter Gene, die für terminale Differenzierung (MMP13), osteogene Differenzierung über Stimulation des Wnt Signalwegs ( $\beta$ -Catenin) oder die Kontrolle der osteoblastischen Expression von Typ-I und Typ-X Kollagen (RUNX2) verantwortlich sind. In guter Übereinstimmung mit zuvor erhaltenen Ergebnissen von Scavo und Kollegen<sup>203</sup> wurde letztlich auch die adipogene Differenzierung der MSZ in Monolayerkultur infolge der IGF-I Überexpression stimuliert.

Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse, dass es sich bei dem Konzept zur genetischen Modifikation von MSZ um ein vielversprechendes Werkzeug im Bereich der Knorpelreparatur handelt und dass der Gentransfer mittels rAAV zur Überexpression von IGF-I die biologischen und chondrogenen Eigenschaften der enthaltenen Stammzellen stimulieren kann. Dennoch ist eine sorgfältige Regulierung der rAAV Expression notwendig, um die Effekte von Hypertrophie und terminaler Differenzierung für weiterführende Ansätze in klinisch relevanten *in vivo* Modellen zu kontrollieren.

## **II. rAAV-vermittelte Überexpression von TGF- $\beta$ in humanen, aus Knochenmark isolierten MSZ**

Diese Arbeit wurde publiziert als:

**Frisch J**, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor- $\beta$  via recombinant adeno-associated viral vectors. Hum Gene Ther 2014; 25(12):1050-60; IF 3,623.



**Abb. 19:** Graphische Zusammenfassung der Publikation II.

MSZ = Mesenchymale Stammzelle.

### **Zusammenfassung:**

Basierend auf der Grundidee sowie den Ergebnissen der zuvor genannten Studie über die genetische Manipulation von MSZ mit IGF-I wurden in dieser Arbeit die Effekte der Überexpression eines zweiten chondrogenen Faktors<sup>95,204</sup>, des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , auf das biologische Verhalten und die Fähigkeit zur Differenzierung der isolierten MSZ überprüft.

Die Methoden wurden hierfür identisch zur zuvor genannten Studie gewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Aus Knochenmark isolierte MSZ<sup>85,129</sup> wurden mittels rAAV-



Vektoren zur Überexpression von TGF- $\beta$  *versus* Reporter gen (*LacZ*) genetisch modifiziert und anschließend für 21 Tage in undifferenzierten (1 – MOI 20) oder adipogen und osteogen differenzierten (2 – MOI 8) Monolayerkulturen sowie chondrogen differenzierten 3D Pelletkulturen (3 – MOI 4) mit speziellen Medien kultiviert. rAAV-*lacZ* mit dem *E.coli*  $\beta$ -Galactosidase Gen (*LacZ*) diente auch hier für alle Versuche als Reporter gen und Kontrolle, rAAV-hTGF- $\beta$  trägt eine humane TGF- $\beta$ 1 cDNA (1,2 kb). Beide Vektoren stehen unter Kontrolle des CMV-IE Promotors/Enhancers und die Herstellung, Aufreinigung und Titration wurden nach Routineprotokollen durchgeführt<sup>85,129,200</sup>. Die Auswertung der Effekte des Gentransfers auf die biologischen und chondrogenen sowie hypertrophen, adipogenen und osteogenen Eigenschaften der MSZ erfolgte mittels histologischer Färbungen, biochemischer Assays und real-time RT-PCR Analysen.

Sowohl in undifferenzierten MSZ (1) als auch in chondrogen differenzierten 3D Pelletkulturen (3) konnte für bis zu 21 Tage eine statistisch signifikante Steigerung der Transgenexpression mit bis zu 87% Transduktionseffizienz in den mit TGF- $\beta$  transduzierten Proben verglichen mit den jeweiligen Kontrollen nachgewiesen werden, in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IGF-I Vergleichsstudie (I.) sowie weiteren Arbeiten, die sich mit rAAV-Gentransfer befassten<sup>85,129,194,198,205</sup>. Die rAAV-vermittelte Produktion von TGF- $\beta$  wies jedoch generell geringere Werte auf als in vergleichbaren zuvor durchgeführten Studien über den TGF- $\beta$  Gentransfer in MSZ Monolayer<sup>195</sup>- und Pelletkulturen<sup>135,184,194</sup>. Diese Arbeiten verwendeten jedoch deutlich höhere rAAV Vektordosen (engl.: *Multiplicity of Infection* – MOI 1000 *versus* 20)<sup>194,195</sup> und/oder eine andere Vektorklasse (Adenoviren)<sup>135,184</sup> und erlaubten dennoch nur eine kurz anhaltende Transgenexpression (weniger als 14 Tage *versus* mindestens 21 Tage bei rAAV mit geringeren MOIs). Die TGF- $\beta$  Überexpression führte zu einer Steigerung der proliferativen und anabolen Eigenschaften der undifferenzierten Monolayerkulturen (1) sowie der chondrogen differenzierten 3D Pelletkulturen (3), höchstwahrscheinlich zurückzuführen auf die langanhaltende rAAV-vermittelte Produktion des Wachstumsfaktors. In den Pelletkulturen wurde zusätzlich auch das Differenzierungspotential der mit TGF- $\beta$  transduzierten Proben im Vergleich zu den *LacZ* Kontrollen erhöht, nachgewiesen durch gesteigerte Expression und Produktion von Proteoglykanen, Aggrecan und Typ-II Kollagen. Eine mögliche Erklärung für diese chondrogene Stimulation liefert die zusätzlich nachgewiesene verstärkte Anregung des chondrogenen SOX9 Signalwegs nach Transduktion im Vergleich zur Kontrolle. Ähnlich zu den Ergebnissen der IGF-I Vergleichsstudie wurde auch hier in den mit TGF- $\beta$  transduzierten Pelletkulturen (3) verglichen mit den jeweiligen Kontrollen eine verstärkte Expression verschiedener Marker für Hypertrophie und Osteogenese (Typ-I Kollagen, Typ-X Kollagen, Osteopontin) nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen zuvor erhaltene Beobachtungen hypertropher Effekte bei

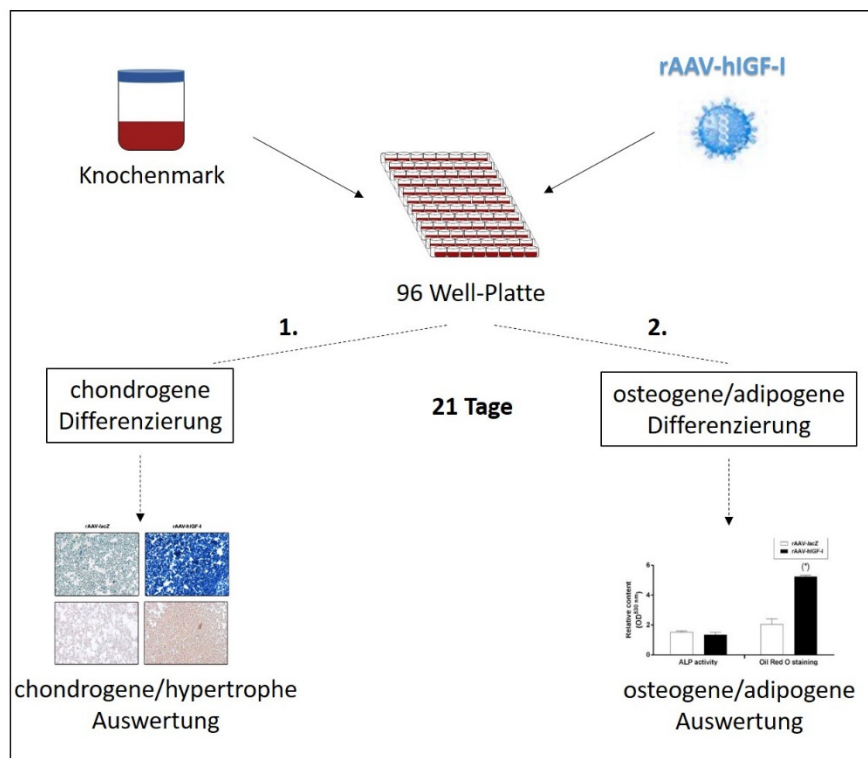
Anwendung von TGF- $\beta$  in rekombinanter Form oder mittels adenoviralem Gentransfer<sup>30,135,206-208</sup> und sind unter anderem auf die zusätzlich nachgewiesene Expressionssteigerung bestimmter Hypertrophie-assoziiierter Gene (MMP13,  $\beta$ -Catenin, IHH) zurückzuführen. Auch die adipogene und osteogene Differenzierung in Monolayerkulturen (2) wurde infolge der TGF- $\beta$  Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen stimuliert, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der IGF-I Vergleichsstudie (I.) sowie ähnlichen Arbeiten basierend auf adenoviralem Gentransfer<sup>135</sup>.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  ein weiterer potentieller Kandidat zur Stimulation der chondrogenen Differenzierungskapazitäten von aus Knochenmark isolierten MSZ darstellt. Auch hier besteht für eine zukünftige Anwendung in klinisch relevanten *in vivo* Ansätzen die Notwendigkeit einer Expressionskontrolle zur Reduktion der Effekte von Hypertrophie und terminaler Differenzierung. Ein direkter Vergleich der beiden Faktoren bezüglich ihrer Wirkung auf isolierte Stammzellen mit Interpretation der Präferenz befindet sich im Diskussionsteil der Arbeit.

### **III. rAAV-vermittelte Überexpression von IGF-I in humanen Knochenmarkaspiraten**

Diese Arbeit wurde publiziert als:

**Frisch J**, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I. *Tissue Eng Part A* 2015; 21(17-18):2460-71; IF 4,448.



**Abb. 20:** Graphische Zusammenfassung der Publikation III.

#### **Zusammenfassung:**

Eine bleibende Schwierigkeit bei der Verwendung von isolierten Zellen ist die Notwendigkeit von mehreren extensiven und zeitintensiven Arbeitsschritten zur Zellisolation und –expansion. Eine direkte Verwendung von Knochenmark anstelle isolierter Stammzellen bietet demnach eine Vereinfachung dieses Ansatzes, die in einem einstufigen Verfahren durchgeführt werden kann und bereits Teil präklinischer und auch klinischer Studien ist<sup>86-89</sup>. Genetische Modifikationen zur Verbesserung der chondroregenerativen Eigenschaften solcher Proben wurden bisher kaum durchgeführt<sup>146,147</sup>, eine (engl.) *Proof of Concept* Studie zum Gentransfer mittels rAAV Vektoren wurde erst kürzlich veröffentlicht<sup>148</sup>. Basierend auf den Ergebnissen einer der zuvor durchgeführten Studien, die einen positiven Einfluss einer IGF-I

Überexpression auf die proliferativen, biosynthetischen und chondrogenen Eigenschaften isolierter MSZ aufzeigte (I.), wurde in der vorliegenden Studie die gleiche genetische Manipulation in vollständigen Knochenmarkaspiraten getestet.

Patienten, die einer vollständigen Knie-Arthroplastik unterzogen wurden, stellten Knochenmarkspenden zur Verfügung, die unmittelbar nach Entnahme mit Hilfe von rAAV Vektoren transduziert wurden<sup>148</sup>. Die Vektorzusammensetzung und –herstellung von rAAV-*lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase) und rAAV-hIGF-I wurden zuvor (I.) bereits beschrieben. Humanes Knochenmark wurde unmittelbar nach Entnahme mit rAAV-hIGF-I *versus* rAAV-*lacZ* genetisch modifiziert (MOI ~ 10) und für 21 Tage in chondrogenem (1) sowie adipogenem und osteogenem (2) Medium kultiviert. Die Auswirkungen des Gentransfers auf proliferative Eigenschaften sowie chondrogenes Differenzierungspotential und Hypertrophieeffekte wurden mittels histologischer Färbungen, biochemischer Assays und real-time RT-PCR Analysen untersucht.

Über den gesamten Analysezeitraum konnte in den transduzierten Proben eine ausgeprägte (~80% IGF-I<sup>+</sup> Zellen) und im Vergleich zur Kontrolle (*LacZ*) verstärkte Transgenexpression detektiert werden, die im Weiteren zu einer Stimulation der proliferativen, biosynthetischen und chondrogenen Eigenschaften führte. Diese Effekte wurden nachgewiesen durch erhöhte Zelldichte, gesteigerten DNA-Gehalt sowie Stimulation von Matricelementen und des chondrogenen SOX9 Signalwegs. Die detektierten Transgenexpressionslevel waren vergleichbar mit zuvor erhaltenen Ergebnissen in isolierten MSZ (I.) sowie der Pilotstudie mit rAAV-vermitteltem Gentransfer in Knochenmarkaspirate<sup>148</sup>, wiesen jedoch geringere Werte auf als in zuvor beschriebenen Studien über adenoviralen Gentransfer in Knochenmark von Kaninchen oder Schweinen<sup>146,147</sup>, bei denen wiederum auch deutlich höhere Vektordosen verwendet wurden. Zusätzlich zeigten wir, dass die genetische Modifikation der Knochenmarkaspirate zu einer gesteigerten Expression von hypertrophen und osteogenen Markern führte, ein Effekt, der von leicht verstärkten Level an MMP13 (terminale Differenzierung), ALP und OP (osteogene Marker), RUNX2 (Kontrolle der osteoblastischen Expression von COL1, COL10 und MMP13),  $\beta$ -Catenin (Mediator des Wnt Signalwegs zur osteogenen Differenzierung) und IHH (Hypertrophie-Marker) sowie geringer Reduktion der PTHrP Expression (anti-hypertropher Marker) begleitet wurde. Dass diese Effekte lediglich in Form von Trends ohne statistische Signifikanz nachzuweisen waren kann auf ein zeitversetztes Differenzierungspotential des Knochenmarks verglichen mit isolierten MSZ zurückzuführen sein (nur Teileffekte an Tag 21 *versus* mögliche vollständige Expression an Tag 40 – 50<sup>209,210</sup>), bestätigt aber dennoch zuvor erhaltene Ergebnisse<sup>211</sup> sowie die Schlussfolgerungen der IGF-I Studie mit isolierten MSZ (I.). Auch die hier detektierte,

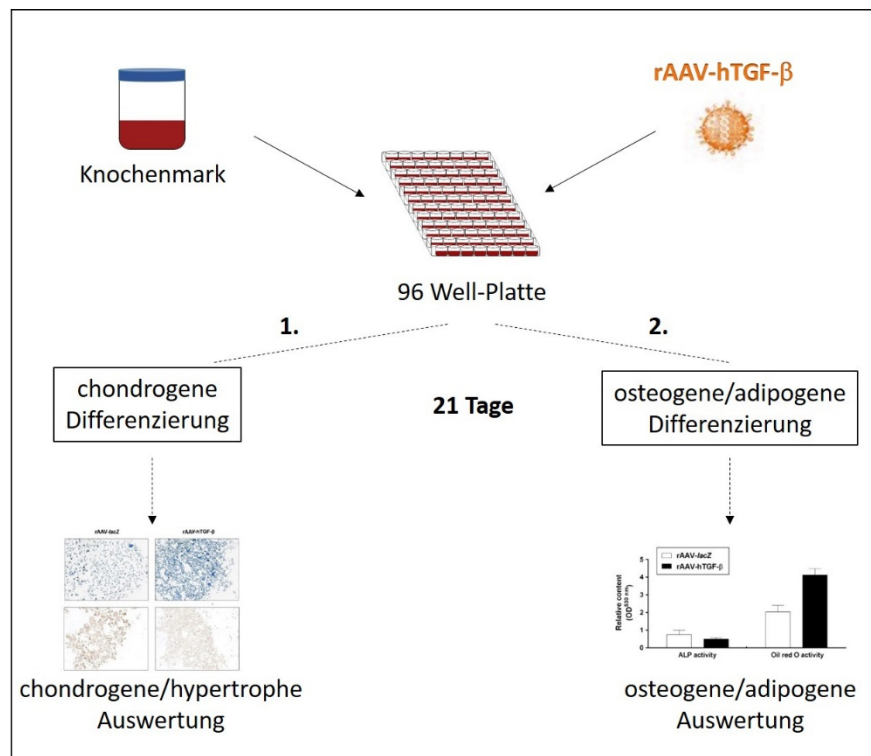
signifikante Steigerung der adipogenen Differenzierung durch IGF-I Überexpression deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen<sup>203</sup> und unserer MSZ Vergleichsstudie (I.).

Der Gentransfer von chondrogenen und/oder chondroreparativen Faktoren in Knochenmark-aspirate mittels rAAV Vektoren stellt einen vielversprechenden Ansatz im Bereich der Knorpelforschung dar, mit dem Ziel der Transplantation solcher genetisch veränderter Proben in verletzte Knorpelbereiche. Verglichen mit anderen, komplexeren und invasiveren Methoden wie beispielsweise der Implantation isolierter Vorläuferzellen, handelt es sich hierbei um eine praktische Alternative, die in einem einstufigen Prozess umgesetzt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch vollständige Knochenmarkaspirate mittels rAAV Vektoren zur Überexpression von IGF-I genetisch verändert werden können, die im Weiteren zu einer vergleichbaren Stimulation der proliferativen und chondrogenen Eigenschaften der Proben führt. Eine kontrollierte Expression des Wachstumsfaktors ist dennoch auch hier notwendig, um eine geeignete Balance zwischen chondrogener Stimulation und Reduktion der Hypertrophieeffekte zu erreichen.

#### **IV. rAAV-vermittelte Überexpression von TGF- $\beta$ in humanen Knochenmarkaspiraten**

Diese Arbeit wurde publiziert als:

**Frisch J**, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. TGF- $\beta$  gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. J Cell Mol Med 2016; 20(3):430-40; IF = 4,938.



**Abb. 21:** Graphische Zusammenfassung der Publikation IV.

#### **Zusammenfassung:**

Abschließend wurde auch der zweite chondrogene Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  bezüglich der Effekte einer Überexpression via rAAV Vektoren auf die biologischen und chondrogenen Eigenschaften von Knochenmarkaspiraten überprüft.

Auch hier wurden die Methoden identisch zur zuvor genannten Studie (III.) gewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Knochenmarkspenden wurden unmittelbar nach Entnahme mit rAAV Vektoren transduziert<sup>148</sup> (MOI ~ 10), die Vektorzusammensetzung und –herstellung von rAAV-lacZ ( $\beta$ -Galactosidase) und rAAV-hTGF- $\beta$  wurden zuvor (II.) bereits beschrieben<sup>85,129,200</sup>. Die Kultivierung fand anschließend für 21 Tage in chondrogenem (1), sowie adipogenem und osteogenem (2) Medium statt. Evaluierungen bezüglich proliferativer

Eigenschaften sowie chondrogenem Differenzierungspotential und Hypertrophieeffekten wurden mittels histologischer Färbungen, biochemischer Assays und real-time RT-PCR Analysen durchgeführt.

TGF- $\beta$  Gentransfer wurde erfolgreich durch langanhaltende, verstärkte Transgenexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen, die generellen Expressionslevel lagen hierbei in einem Bereich vergleichbar mit TGF- $\beta$  transduzierten isolierten MSZ (II.) sowie mit Knochenmarkaspiraten der IGF-I Vergleichsstudie (III.). Die TGF- $\beta$  Überexpression führte weiterhin zu einer signifikanten Steigerung der proliferativen und chondrogenen Eigenschaften der Knochenmarkaspirate, nachgewiesen mittels immunhistochemischer und biochemischer Methoden sowie real-time PCR Analysen durch Steigerungen des DNA-Gehalts und wichtiger Knorpelmatrixproteine (Aggrekan, Typ-II Kollagen) im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Von großer Bedeutung für die vorliegende Arbeit ist die Reduktion von Hypertrophie und terminaler Differenzierung, die wir infolge der TGF- $\beta$  Überexpression im Knochenmark verglichen mit der Kontrolle (*LacZ*) detektieren konnten. Dieses Ergebnis steht in auffälligem Kontrast zu Untersuchungen mit isolierten MSZ bei Anwendung von TGF- $\beta$  in rekombinanter Form oder mittels viralem Gentransfer<sup>30,135,206-208</sup>, die nach Transduktion verstärkte hypertrophe Effekte aufwiesen, und ist auf das spezielle biologische Umfeld der MSZ im Knochenmark zurückzuführen.

Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse deutlich die Vorteile einer genetischen Modifikation von Knochenmarkaspiraten durch rAAV-vermittelten Gentransfer des chondrogenen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  bezüglich der Anwendung als einfaches, einstufiges und effektives Verfahren zur Verbesserung der Knorpelreparatur. Viele der Faktoren, die an der Knorpelregeneration beteiligt sind, wiesen in bisherigen Studien hypertrophe Eigenschaften als unerwünschten Nebeneffekt auf. Dieser Aspekt betont die Wichtigkeit der hier nachgewiesenen Reduktion solcher Hypertrophieeffekte infolge der genetischen Manipulation mit TGF- $\beta$ . Dennoch muss in weiteren Studien untersucht werden, ob durch diesen Ansatz eine vollständige Knorpelreparatur erreicht werden kann, oder ob eine kombinierte Anwendung mehrerer chondrogener/chondroreparativer Faktoren zusätzliche Vorteile bringen könnte.

### 3. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der genetischen Manipulation von Stammzellen mittels rekombinanter adeno-assoziiierter viraler (rAAV) Vektoren. Die Applikation von Knochenmark und daraus isolierten primären Zellen von Patienten mit Knorpelerkrankungen, die letztendlich die Zielgruppe der hier überprüften Methoden darstellen, ist ein Ansatz zur zielgerichteten Therapie. Durch den Einschluss von Proben von insgesamt 49 Patienten wurde eine Auswertung mittels statistischer Analysemethoden ermöglicht und patientenspezifische Variabilitäten weitestgehend minimiert. Die therapeutischen Gene wurden aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren gewählt, die innerhalb der Knorpelentwicklung und –reparatur eine überaus wichtige Rolle spielen. Sowohl IGF-I als auch TGF- $\beta$  wurden bereits als vielversprechende Faktoren identifiziert, da sie in zuvor durchgeführten Studien eine Stimulation der Matrixproduktion und der chondrogenen Differenzierung von isolierten MSZ induzierten<sup>184,192-194,212-217</sup> sowie *in vivo* nach Transplantation in Knorpeldefekte eine Stimulation der Knorpelreparatur aufwiesen<sup>192-194,212,216,218</sup>. Dennoch wurde für beide Faktoren bisher keine vergleichbare Studie veröffentlicht, die mit den vorteilhaften rAAV Vektoren sowie MSZ niedriger Passage arbeiten. Hohe Zellpassagen können die biologischen Eigenschaften von MSZ erheblich beeinflussen, so zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass humane MSZ nach langer *ex vivo* Expansion malignen Transformationen mit Veränderungen der Morphologie sowie der Proliferationsrate unterliegen<sup>219</sup>. Eine Anwendung niedriger Zellpassagen ist demnach vorteilhafter, um die multipotenten, trophischen und immunmodulatorischen Eigenschaften der MSZ<sup>15,61-65</sup> zur Behandlung von Knorpelverletzungen vollständig zu nutzen. Der Gentransfer mittels rAAV Vektoren in MSZ niedriger Passagen ( $\leq 2$ ) liefert also einen wichtigen Meilenstein, um das Differenzierungsverhalten nach genetischer Manipulation in frühen Zellstadien zu untersuchen (*Hypothese 1*). Wie bereits erwähnt ist die Expansion von Stammzellen zusätzlich ein arbeits- und zeitintensiver Prozess und bereits die Isolation kann sich auf die Zellausbeute sowie den Phänotyp der Zellen auswirken, insbesondere durch unterschiedliche Isolationsmethoden, Kultivierungsbedingungen oder Medienzusätze<sup>219</sup>. Demnach liefert die direkte Anwendung von Knochenmark einen attraktiven Ansatz, da sie in einem einstufigen Verfahren durchgeführt werden kann und zusätzlich den Vorteil bietet, die Stammzellen in ihrer natürlichen, biologischen Umgebung zu bewahren. Die Transplantation solcher Aspire wurde bereits in mehreren klinischen Studien getestet<sup>86-89</sup>, über die genetische Manipulation von Knochenmarkaspiraten ist bisher nur vergleichsweise wenig bekannt. Die in der vorliegenden Studie durchgeführte Untersuchung der Effekte des Gentransfers auf die chondroreparativen Eigenschaften vollständiger Knochenmarkaspirate wurde bisher in der Literatur nicht



beschrieben und liefert als Vereinfachung der Konzepte mit isolierten MSZ eine wichtige Fragestellung im Bereich der Knorpelforschung (*Hypothese 2*).

### Überprüfung der Hypothese 1 mit allgemeiner Interpretation

***Die Ergebnisse der Publikationen I und II bestätigten klar die Hypothese, dass die Überexpression der Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$  via rAAV Vektoren die chondrogenen Differenzierungseigenschaften von aus Knochenmark isolierten humanen mesenchymalen Stammzellen stimuliert.***

In beiden Studien wurden sowohl proliferative Eigenschaften stimuliert als auch die Produktion von Matrixkomponenten durch Anregung des chondrogenen SOX9-Signalwegs erhöht, wodurch das Konzept für eine Anwendung im Bereich der Knorpelreparatur eine bedeutende Rolle erlangt. Die zusätzlich nachgewiesene Stimulation von Hypertrophie, Adipogenese und Osteogenese infolge der Überexpression der Wachstumsfaktoren ist aufgrund der bereits diskutierten multipotenten Eigenschaften der MSZ sowie der dokumentierten Beteiligung von IGF-I und TGF- $\beta$  an diesen Differenzierungslinien nicht überraschend. IGF-I wurde in der Literatur ausgiebig als Stimulator der Differenzierung zu Osteozyten<sup>178</sup> und Adipozyten<sup>179-181</sup> beschrieben, was durch die vorliegende Studie weiterhin bestätigt wurde. Eine genaue Analyse der zugrunde liegenden Signalwege wurde hier nicht durchgeführt, basierend auf Literaturangaben<sup>174</sup> sowie Ergebnissen aus früheren Studien mit IGF-I Gentransfer in Knorpelimplantaten<sup>200</sup> ist eine Aktivierung von sowohl ERK1/2 als auch PI3K als Downstream-Effektoren wahrscheinlich. TGF- $\beta$  zeigt in der Literatur vor allem im Bereich der Adipogenese und Osteogenese eine Smad-abhängige, ambivalente Wirkung. Unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen ist davon auszugehen, dass durch die genetische Manipulation der MSZ mit TGF- $\beta$  hauptsächlich eine Aktivierung des Smad1/5/8 Signalwegs erfolgt, der nachweislich hypertrophe und adipogene Prozesse anregt<sup>9,101,179,197</sup>. Obwohl die Stimulation der Adipogenese nach Literaturangaben von Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie hauptsächlich durch BMP-induzierte Aktivierung des Smad1/5/8 Signalwegs verursacht wird<sup>179,197</sup>, ist eine Beteiligung dieses Zweigs auch durch TGF- $\beta$  als zweite Unterklasse mit überlappender Signaltransduktion naheliegend und liefert somit eine Erklärung der Effekte auf die adipogene Differenzierung. Diese Ergebnisse stehen in starkem Kontrast zu früheren Untersuchungen der durch TGF- $\beta$  Gentransfer aktivierten Signalwege in Knorpelimplantaten<sup>205</sup>, womöglich zurückzuführen auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, eine detaillierte Untersuchung der beteiligten Signalwege stand jedoch nicht im Fokus der Arbeit. Hypertrophie und terminale Differenzierung sowie Adipogenese und Osteogenese sind unerwünschte Prozesse innerhalb der Knorpelentwicklung und -reparatur,

da sie einer Rekonstruktion der natürlichen Struktur des hyalinen Knorpels im Weg stehen. Daher ist es für das vorliegende Konzept von großer Bedeutung, die Stimulation solcher Prozesse nach genetischer Manipulation bestmöglich zu reduzieren. Hierfür stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung, die im weiteren Verlauf der Arbeit ausführlich diskutiert werden.

### Überprüfung der Hypothese 2 mit allgemeiner Interpretation

***Die genetische Manipulation von Knochenmarkaspiraten mit IGF-I und TGF- $\beta$  als Vereinfachung des Konzepts der Nutzung isolierter Stammzellen zeigte durch den Nachweis signifikanter Steigerungen der Proliferation und Matrixsynthese (mit Beteiligung des SOX9 Signalwegs) vergleichbare Effekte bezüglich der Stimulation der chondroreparativen Eigenschaften, wodurch auch die zweite Hypothese der vorliegenden Arbeit deutlich bestätigt wurde.***

Im Vergleich zu isolierten MSZ wurden interessanterweise kaum Unterschiede der Transgenexpressionslevel festgestellt, obwohl in den Aspiraten eine deutlich größere Gesamtzellzahl mit einem geringeren prozentualen MSZ-Anteil vorhanden ist. Während zu Beginn des Experiments alle vorhandenen Zellsubpopulationen im Knochenmark (z.B. MSZ, hämatopoetische Zellen, Fibroblasten) durch die rAAV Vektoren genetisch modifiziert werden können, ist nach kontinuierlicher chondrogener Stimulation mit der Zeit davon auszugehen, dass hauptsächlich die chondrogen differenzierbaren MSZ vollständig zum chondrogenen Phänotyp übergehen<sup>19,220</sup>. Die im Knochenmark detektierten Ergebnisse bezüglich der Zellproliferation wiesen erhöhte Werte im Vergleich zu isolierten MSZ auf, was möglicherweise auf das Vorhandensein anderer mitogener Faktoren im Knochenmark zurückzuführen ist<sup>19,220</sup>. Weiterhin können auch Zellsubpopulationen des Knochenmarks, die in der frühen Phase nach Transduktion genetisch modifiziert wurden, Einfluss auf proliferative Prozesse nehmen, wohingegen später, unter kontinuierlichem Einfluss von chondrogenem Medium, hauptsächlich rAAV-modifizierte MSZ solche Prozesse kontrollieren (parakrine versus autokrine Effekte)<sup>19,220</sup>. Trotz der nachgewiesenen Steigerung der biosynthetischen und chondrogenen Eigenschaften durch Transduktion im Vergleich zu den Kontrollen, waren interessanterweise die Level der Matrixsynthese verglichen mit zuvor erhaltenen Ergebnissen in isolierten MSZ in den Versuchen mit Knochenmarkaspiraten generell reduziert. Diese Resultate können auf einen geringeren Aktivierungsstatus der Vorläuferzellen im Knochenmark hinweisen, auf nachteilige Einflüsse rückständiger Zellen und/oder auf mitogene versus anabole Effekte der Wachstumsfaktoren in den Aspiraten<sup>19,200,220</sup>. Zusätzlich können diese Beobachtungen auch auf eine zeitliche Verschiebung der Matrixsynthese im Knochenmark zurückzuführen sein, die erst zu späterem Zeitpunkt einsetzt und an Tag 21 (ein

Zeitpunkt, der basierend auf Literaturrecherchen im Bereich der Knorpelreparatur ausgewählt wurde<sup>146,147</sup>) noch nicht komplett ausgeprägt ist<sup>19,220</sup> (mögliche vollständige Deposition zwischen Tag 40 und 50<sup>209,210</sup>).

Bezüglich der Effekte auf Hypertrophie, Adipogenese und Osteogenese lieferten die Untersuchungen am genetisch manipulierten Knochenmark interessante Ergebnisse. Der Gentransfer von IGF-I führte zu einer generellen Stimulation aller Prozesse, in guter Übereinstimmung mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen in isolierten MSZ (I.) sowie Literaturangaben bezüglich der Eigenschaften des Wachstumsfaktors<sup>178-181</sup>. Das wohl wichtigste Ergebnis dieser Studien ist jedoch die Reduktion von Hypertrophie und Osteogenese in den Aspiraten infolge der TGF- $\beta$  Überexpression (IV.), begleitet von einer bleibenden Stimulation der Adipogenese. Diese Resultate stehen in auffälligem Kontrast zu den erhaltenen Ergebnissen mit isolierten MSZ (II.), die nach TGF- $\beta$  Überexpression eine Steigerung des Differenzierungspotentials jeder Linie aufwiesen. Hierbei spielt hauptsächlich das biologische Milieu eine Rolle, das im Gegensatz zu isolierten MSZ in den Knochenmarkaspiraten auf die Zellen wirken kann. Darin können von anderen vorhandenen Zelltypen nützliche Faktoren produziert (parakrine Expression) sowie spezifische Signalwege aktiviert werden, die im isolierten Zustand nicht abrufbar sind und Prozesse wie Hypertrophie und terminale Differenzierung verzögern, ohne das chondrogene Potential zu beeinträchtigen<sup>220</sup>. So ist beispielsweise möglich, dass durch den Einfluss der speziellen Zellumgebung statt Smad1/5/8 Aktivierung (pro-hypertroph) zunächst hauptsächlich der zweite mögliche TGF- $\beta$  Signalweg angeregt wird, der über Smad2/3 Phosphorylierung zur Stabilisierung von SOX9 und Inhibierung von RUNX2 führt und somit anti-hypertroph wirkt<sup>9,101</sup>. Eine detaillierte Untersuchung dieser Signalwege wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Ähnliche Studien mit Anwendung des identischen rAAV-hTGF- $\beta$  Vektors in Knorpelimplantaten lieferten jedoch vergleichbare Ergebnisse. Venkatesan *et al.*<sup>205</sup> konnten nach Überexpression von TGF- $\beta$  in arthritischem Knorpel verstärkte Level des ALK5 Typ-I Rezeptors aufweisen, der nachweislich mit Smad2/3 Aktivierung assoziiert ist (*versus* ALK 1 als Stimulator von Smad1/5/8). Diese ALK5 Steigerung infolge des Gentransfers wurde in der genannten Studie in Verbindung mit anti-hypertrophen Effekte detektiert, weshalb eine verstärkte Beteiligung dieses Signalwegs als Ursache der Hypertrophie-Reduktion auch in der vorliegenden Arbeit anzunehmen ist. Die Stimulation der Differenzierung der adipogenen Linie infolge der TGF- $\beta$  Überexpression stimmt jedoch mit den Ergebnissen der Studien mit isolierten MSZ (II.) sowie der Anwendung von IGF-I im Knochenmark (III.) überein. Wie bereits diskutiert wird ein solcher Effekt vorwiegend durch eine Aktivierung von Smad1/5/8 verursacht<sup>179,197</sup>, demnach ist auch die Anregung dieses zweiten TGF- $\beta$  Signalwegs unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen nicht vollständig auszuschließen. Somit lässt sich

schlussfolgern, dass im Knochenmark grundsätzlich beide Smad-Signalwege durch TGF- $\beta$  aktiviert werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass der pro-hypertrophe Smad1/5/8 Signalweg im Verhältnis zu dem parallel aktivierten Smad2/3 Signalweg weniger stark angeregt wird und somit die anti-hypertrophen Effekte von Smad2/3 überwiegen. Auffallend diesbezüglich ist auch, dass die Adipogenese im Knochenmark verglichen mit den Ergebnissen in isolierten MSZ in geringerem Ausmaß aktiviert wurde (2,0- *versus* 2,3-fach), was ebenfalls für eine weniger stark ausgeprägte Anregung des adipogenen und hypertrophen Smad1/5/8 Signalwegs spricht. Bei allen Schlussfolgerungen bezüglich der beteiligten Signalwege handelt es sich um auf Literaturangaben bezogene Hypothesen. Eine detaillierte Analyse stand nicht im Fokus der Arbeit, bietet aber basierend auf den hier erhaltenen Ergebnissen eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien.

Zusammenfassend eröffnet die Bestätigung der Hypothese 2 neue Möglichkeiten im Bereich der Knorpelforschung, die sich mit der Anwendung von genetisch verändertem Knochenmark als einstufigen Prozess zur Stimulation der Knorpelregeneration befassen.

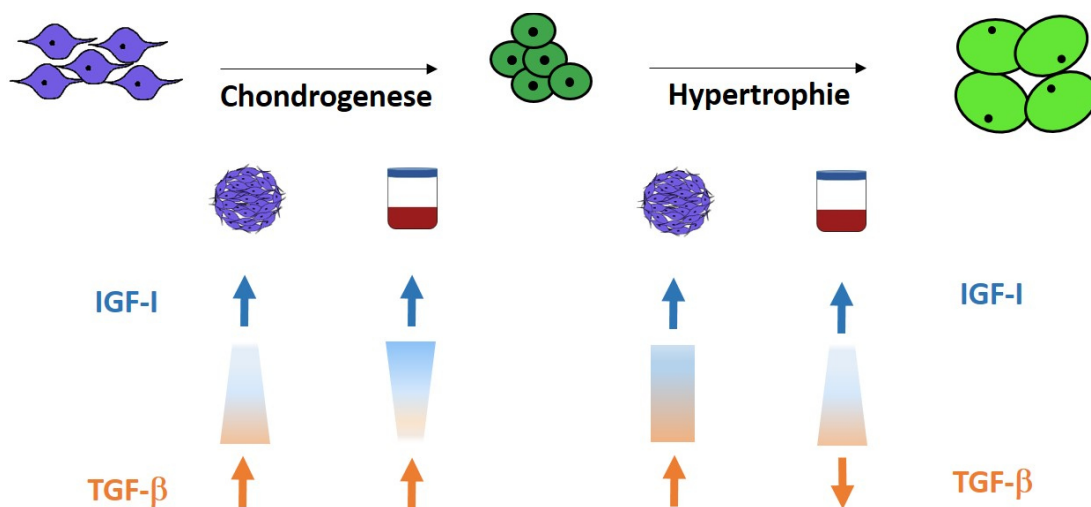
#### Diskussion des internen Interpretationsziels

Obwohl sich durch die erhaltenen Ergebnisse beide Wachstumsfaktoren deutlich als potentielle Kandidaten für die Knorpelforschung erwiesen, konnten interessanterweise dennoch auffallende Unterschiede zwischen den Effekten der Transduktion mit IGF-I und TGF- $\beta$  nachgewiesen werden, die sowohl vom Versuchsansatz (MSZ *versus* Knochenmark) als auch von den einzelnen Untersuchungsmerkmalen (Transgenexpression, Proliferation, Chondrogenese, Hypertrophie) abhängig waren. Mit Ausnahme der MSZ Pelletkulturen war in allen Versuchen (MSZ Monolayer, Knochenmark) die TGF- $\beta$  Transgenexpression stärker ausgeprägt als die des Faktors IGF-I. Zunächst lässt dies auf eine stärkere Wirksamkeit des Faktors schließen, die Effekte können jedoch auch durch unterschiedliche Sensitivität der Transgen-Detektionssysteme sowie abweichendes Transduktionspotential der einzelnen Vektoren infolge des Herstellungsprozesses hinweisen. Auffallend war hierbei in den Knochenmarkaspiraten, dass die Transgenexpression von TGF- $\beta$  zu frühen Zeitpunkten zwar deutlich stärkere Werte verglichen mit IGF-I aufwies, jedoch über den Zeitraum von 21 Tagen eine stetige Reduktion der Expressionslevel nachgewiesen wurde, wohingegen IGF-I zu Versuchsende (Tag 21) einen Expressionsschub mit Werten oberhalb der Marke des ersten Messzeitpunkts erfuhr. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass der TGF- $\beta$  Gentransfer zur effektiveren Transgenexpression führt, die aber schneller verloren geht als bei IGF-I, höchstwahrscheinlich zurückzuführen auf die unterschiedlichen Signalwege der beiden Faktoren<sup>177,221</sup>. In den Studien mit isolierten MSZ (I. und II.) waren die erhaltenen Ergebnisse

mit wenigen Ausnahmen für beide Faktoren weitestgehend vergleichbar, vor allem aber im Bereich der Chondrogenese erwies sich TGF- $\beta$  jedoch als deutlich effektiver (Abb. 22). Bei genetischer Manipulation des Knochenmarks (III. und IV.) hingegen wurden wichtige Unterschiede detektiert (Abb. 22). Bezüglich der proliferativen sowie hypertrophen und osteogenen Eigenschaften zeigte TGF- $\beta$  deutlich vorteilhaftere Effekte, da durch Gentransfer mit diesem Faktor eine Proliferationssteigerung und sogar eine Reduktion von Hypertrophie und Osteogenese zu beobachten war. Interessant ist jedoch, dass vor allem in den Genexpressionsanalysen (real-time PCR) IGF-I der deutlich effektivere Faktor zur Stimulation der chondrogenen Marker in den Knochenmarkaspiraten darstellte. Biochemische und histologische Analysen wiesen diesbezüglich weitgehend vergleichbare Werte auf. Erklärungen für diese unterschiedlichen Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$  im Knochenmark lassen sich unter anderem durch Verbindung zu den speziellen Eigenschaften der Faktoren, aber auch den einzelnen Transgenexpressionprofilen finden. TGF- $\beta$  ist ein früher Faktor der Chondrogenese und unterstützt nachweislich hauptsächlich Vorgänge der mesenchymalen Kondensation<sup>186</sup> als Vorstufe für den späteren Prozess der chondrogenen Differenzierung, der wiederum neben weiteren wichtigen Faktoren durch IGF-I als Vertreter der späten chondrogenen Faktoren stimuliert wird<sup>177</sup>. Die mit TGF- $\beta$  transduzierten MSZ befinden sich demnach womöglich zum Analysezeitpunkt noch in einem frühen Stadium der chondrogenen Differenzierung nach Stimulation der mesenchymalen Kondensation, wohingegen eine IGF-I Überexpression bereits zur Ausbildung reifer Chondrozyten führte, weshalb durch diesen Faktor stärkere Effekte im Bereich der Chondrogenese nachweisbar sein können. Zusätzlich wurden in der Expressionskinetik von TGF- $\beta$  im Knochenmark zu früheren Zeitpunkten deutlich höhere Werte detektiert als zum Analysezeitpunkt (Tag 21), die IGF-I Transgenexpression erfuhr hingegen bei Versuchsende einen Expressionsschub, eine weitere mögliche Erklärung für Unterschiede der beiden Faktoren bezüglich ihrer chondrogenen Eigenschaften. Der deutliche Gegensatz der Effekte von IGF-I und TGF- $\beta$  auf Hypertrophie und Osteogenese ist letztlich auf die spezifischen Eigenschaften der Faktoren zurückzuführen, die im Vorfeld bereits diskutiert wurden.

Für die Wiederherstellung einer natürlichen hyalinen Knorpelstruktur durch Stammzellen ist zweifellos deren chondrogene Differenzierung von großer Bedeutung, bei einer Interpretation bezüglich der Effektivität der untersuchten Faktoren müssen jedoch alle Parameter berücksichtigt werden, die die Struktur des Reparaturgewebes beeinflussen können. Gesunder Gelenkknorpel besteht ausschließlich aus Chondrozyten in ihrer spezifischen Umgebung<sup>6</sup>, das Vorhandensein von Fett- und Knochenzellen ist für die Wiederherstellung der biologischen Knorpelstruktur demnach unerwünscht. Aufgrund der multipotenten Eigenschaften von MSZ mit neben chondrogenem auch stark ausgeprägtem adipogenem und

osteogenem Differenzierungspotential ist demnach von großer Bedeutung, welchen Effekt die Gentherapie-Kandidaten auf solche Prozesse aufweisen. Trotz der geringeren chondrogenen Stimulation verglichen mit IGF-I im Knochenmark, konnte durch die Überexpression von TGF- $\beta$  noch immer eine statistische Signifikanz im Vergleich zur internen Kontrolle detektiert werden, begleitet von der überaus wichtigen Reduktion von MSZ Hypertrophie und Osteogenese. All diese Aspekte umfassend lässt sich demnach TGF- $\beta$  auch für die genetische Manipulation von kompletten Knochenmarkaspiraten als potentielleres therapeutisches Gen für eine Anwendung im Bereich der Knorpelreparatur einstufen. Eine Überexpression von Wachstumsfaktoren kann immer auch zu nachteiligen parakrinen und autokrinen Nebeneffekten führen, wie beispielsweise einer Stimulation von Proliferation und/oder Differenzierung unerwünschter Zellpopulationen. Diese Effekte bleiben für TGF- $\beta$  zu überprüfen, wurden jedoch bei direkter Anwendung von rAAV Vektoren zur Überexpression anderer Wachstumsfaktoren (IGF-I, FGF-2) in *in vivo* Experimenten mit fokalen Knorpeldefekten<sup>222,223</sup> in unserer Arbeitsgruppe nie detektiert.



**Abb. 22:** Graphische Darstellung des internen Vergleichs zwischen IGF-I und TGF- $\beta$ .

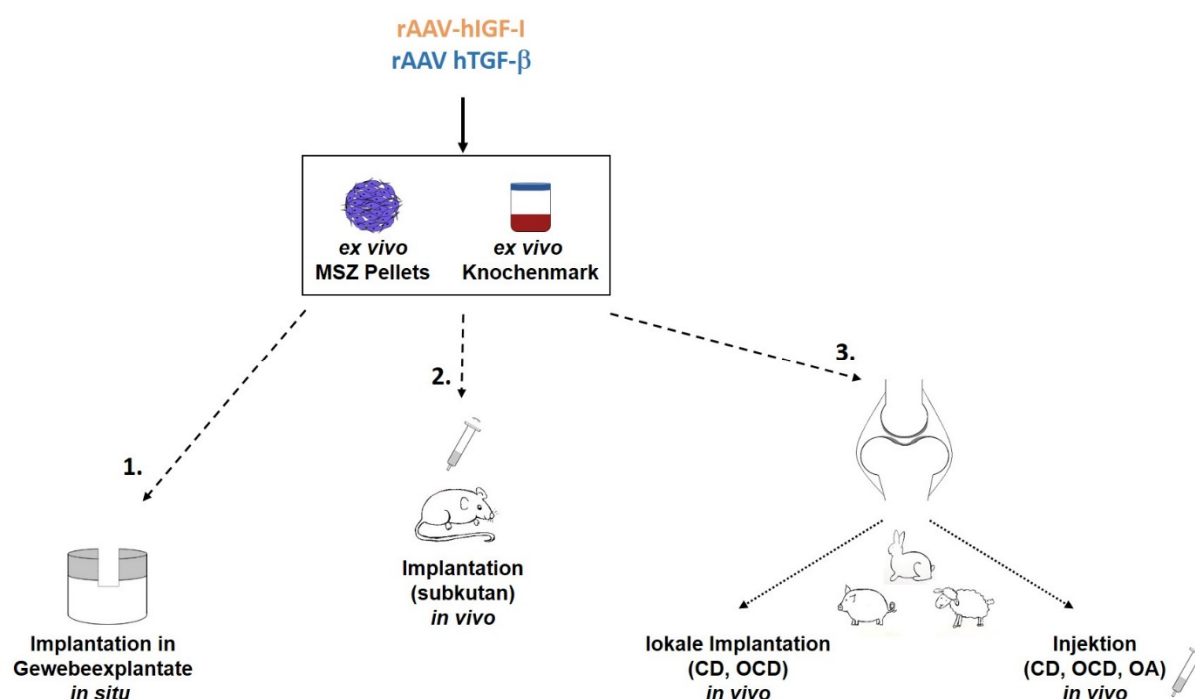
Pfeile symbolisieren Steigerung (↑) oder Reduktion (↓) der Chondrogenese oder Hypertrophie, Farbverlaufsbalken repräsentieren Effizienzunterschiede. IGF-I = (engl.) *Insulin-like Growth Factor I*; TGF- $\beta$  = (engl.) *Transforming Growth Factor  $\beta$* .

**Zusammenfassend wurde innerhalb der vorliegenden Studie TGF- $\beta$  als Faktor mit deutlich höherer Effizienz identifiziert, der für die Anwendung im Bereich der Knorpelreparatur nicht nur zur chondrogenen Stimulation von MSZ in der Lage ist, sondern unter Einfluss des biologischen Milieus der Stammzellen im Knochenmark im Gegensatz zu IGF-I auch unerwünschte Nebeneffekte wie Hypertrophie und Osteogenese reduzieren kann.**

### Ausblick

Zusammenfassend verifizierte die vorliegende Arbeit die genetische Manipulation von isolierten MSZ und vollständigen Knochenmarkaspiraten mit den Wachstumsfaktoren IGF-I und TGF- $\beta$  allgemein als vielversprechendes Werkzeug in der Knorpelreparatur. Hierbei erwies sich die Anwendung des Knochenmarks sowohl bezüglich der Präparation als auch bezüglich der positiven Einflüsse der biologischen Umgebung auf Hypertrophie und Osteogenese als vorteilhaft und TGF- $\beta$  konnte für beide Probenotypen als effizienterer Faktor eingestuft werden. Dennoch ist IGF-I als therapeutisches Gen im Bereich der Knorpelforschung nicht vollständig auszuschließen. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass die hypertrophen und osteogenen Effekte des Faktors bei einer Anwendung in entsprechenden klinisch relevanten *in vivo* Studien unterschiedlich sind, da in diesem Fall zusätzliche parakrine Faktoren zur Verfügung stehen, die solche Prozesse positiv beeinflussen können. So wurde beispielsweise nach direktem Gentransfer von IGF-I in Knorpeldefekten von Kaninchen eine Verzögerung von Hypertrophie und terminaler Differenzierung detektiert<sup>222</sup>, und auch nach Transplantation künstlicher Knorpelkonstrukte aus IGF-I transduzierten Chondrozyten in biologischen (engl.) *Scaffolds* wurde im Reparaturgewebe geringere Typ-I Kollagen Deposition im Vergleich zu Kontrollgruppen detektiert<sup>224</sup>. Es bleibt also zu überprüfen, wie sich eine Überexpression von IGF-I unter den hier gewählten Bedingungen im Rahmen entsprechender *in vivo* Studien auf Hypertrophie und Osteogenese der Zellen des Reparaturgewebes auswirkt. Falls diese unerwünschten Prozesse dennoch eine Rolle spielen, kann auf unterschiedliche Art und Weise versucht werden, ausreichende Level an IGF-I zur chondrogenen Stimulation der Zellen zu produzieren, ohne jedoch frühzeitige hypertrophe und osteogene Prozesse zu aktivieren. Mögliche Ansätze hierfür sind beispielsweise die Anwendung geringerer Vektordosen, der Einsatz gewebspezifischer oder regulierbarer Promotoren, und/oder ein kombinierter Gentransfer mit Genen, die nachweislich Hypertrophie und Osteogenese reduzieren (z.B. FGF-2, SOX-trio, anti RUNX2 siRNA)<sup>4,5,19</sup>. Auch weitere Kombinationen mit anderen potentiellen Faktoren bieten vor allem für Modelle zur Behandlung von Arthrose interessante Ansätze, um an die erhaltenen Ergebnisse anzuknüpfen. Wichtige Kandidaten stellen hierbei Faktoren dar, die degenerative und inflammatorische Prozesse unterbinden, wie beispielsweise Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren oder Interleukin 1 Rezeptorantagonisten<sup>3</sup>. Zusätzlich sind weitere Experimente zur genaueren Aufklärung der Signalwege notwendig, die durch rAAV-induzierte Überexpression von IGF-I und TGF- $\beta$  angeregt werden, sowie detaillierte Charakterisierungen der einzelnen Zellsubpopulationen des Knochenmarks und der speziellen Interaktionsmechanismen des biologischen Milieus mit TGF- $\beta$  bei der Hypertrophie-Reduktion. Hierfür sind beispielsweise FACS Analysen in Planung, die durch Co-Expression bestimmter Oberflächenmarker und Typ-II/Typ-I Kollagen den genauen Zelltyp definieren sollen, der für

die Expression chondrogener/hypertropher Marker verantwortlich ist. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können weiterhin als Basis zur schrittweisen Überführung der Ansätze in klinisch relevante Tiermodelle dienen (Abb. 23). Im ersten Schritt bietet sich hierbei eine *in situ* Untersuchung in Knorpelimplantaten mit künstlich hergestellten Defekten an (Abb. 23, 1.). Anschließende Studien zur anfänglichen *in vivo* Überprüfung der Hypothesen können durch subkutane Implantation in einem Mausmodell umgesetzt (Abb. 23, 2.) und letztlich in orthotope, klinisch relevante Tiermodelle überführt werden (Abb. 23, 3.). Möglichkeiten für orthotope Anwendungen bieten sich durch lokale Transplantation der genetisch veränderten Proben (isolierte MSZ oder Knochenmark) in konstruierte Knorpeldefekte oder durch intraartikuläre Injektion, die zusätzlich auch für Studien zur Behandlung von Arthrose angewendet werden kann.



**Abb. 23:** Schrittweise Überführung der Ansätze in klinisch relevante Tiermodelle.

MSZ = Mesenchymale Stammzellen; CD = Chondraler Defekt; OCD = Osteochondraler Defekt; OA = (engl.) *Osteoarthritis*, Arthrose.

Kombinationen mit biologischen (engl.) *Scaffolds* zur Erzeugung von funktionellen (engl.) *Tissue Engineering* Einheiten sind attraktive Ergänzungen für die genannten *in vivo* Anwendungen, wobei sich für Defektmodelle hauptsächlich solide Biomaterialien eignen und bei diffusen Schädigungen (Arthrose) vorwiegend spezielle Hydrogele zum Einsatz kommen<sup>225</sup>. Interessant ist hierbei, dass Biomaterialien auch speziell zu einer kontrollierten Abgabe der Genvektoren konstruiert werden können, um negative Aspekte der Vektor-



vermittelten Gentherapie wie abstoßende Immunreaktionen oder Zugänglichkeitsprobleme durch physiologische und/oder zelluläre Schranken<sup>226</sup> zu umgehen. Solche Konstrukte können entweder durch Vektorbeladung während des Herstellungsprozesses (Verkapselung) oder durch Einbringen des Vektors in vorgeformte Trägermaterialien (Immobilisierung) hergestellt werden<sup>226</sup>. Die kontrollierte Abgabe erfolgt über Degradierung der Polymermatrix des Biomaterials oder Substrat-vermittelten Vektortransfer, der nur in unmittelbarer Nähe zu den immobilisierten Vektorpartikeln stattfinden kann<sup>226</sup>. Bei der Auswahl der Tiermodelle zur orthotopen Überprüfung der Ansätze in translationalen Bereichen kommt es auf mehrere wichtige Aspekte an, die von Madry *et al.* 2015<sup>227</sup> ausführlich definiert wurden. Einer der wohl wichtigsten Punkte ist die Vergleichbarkeit des anatomischen Aufbaus zwischen Tiermodell und Mensch, gleichzeitig spielen aber auch ethische und technische Faktoren eine entscheidende Rolle. Kein Tiermodell spiegelt den menschlichen Aufbau des Kniegelenks exakt wider, demnach muss für jeden Versuchsansatz durch Abwägen der Vor- und Nachteile das passende Versuchstier sorgfältig diskutiert werden. Zur speziellen Untersuchung von Knorpeldefekten oder Arthrose eignen sich verschiedene Klein- und Großtiermodelle (z.B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Minischweine, Schafe, Ziegen und Pferde<sup>227</sup>), bei denen vor allem Knorpeldicke, -mikrostruktur und -zellularität eine Rolle spielen<sup>227</sup>. Innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurden bisher hauptsächlich Untersuchungen an Kaninchen<sup>222,224,228</sup> und Schafen<sup>229,230</sup> durchgeführt, neuste Studien befassen sich jedoch auch mit der Knorpelreparatur von Minischweinen (Daten noch nicht veröffentlicht). Zur künstlichen Erzeugung der Knorpelverletzungen in solchen Tiermodellen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung: Fokale Defekte werden hauptsächlich durch Pridie-Bohrung, Mikrofrakturierung oder Abrasion verursacht<sup>227</sup>, zur Induktion von Arthrose werden entweder chirurgische (z.B. durch Meniskusrisse oder Durchtrennung des vorderen Kreuzbands = (engl.) *Anterior Crucial Ligament Transection* - ACLT) oder auch pharmakologische Methoden angewendet (z.B. Abtöten der Chondrozyten durch Injektion von Iodessigsäure oder Stimulation degenerativer Prozesse durch Chinolon-Antibiotika)<sup>231</sup>.

Die Anwendung von rAAV Vektoren in *in vivo* Experimenten bietet bezüglich der Sicherheit gegenüber anderen viralen Transfersystemen deutliche Vorteile. Wie bereits erwähnt werden die viralen *rep* und *cap* Sequenzen im rAAV Herstellungsprozess komplett entfernt, wodurch toxische Effekte deutlich verringert werden. Aufgrund der Tatsache, dass rAAV vorwiegend in Form von stabilen Episomen im Zellkern vorliegen, besteht zusätzlich ein reduziertes Risiko für Insertionsmutagenese. Eine Bildung von neutralisierenden Antikörpern infolge einer rAAV Therapie ist aufgrund der hohen AAV Seroprävalenz zwar wahrscheinlich, durch die Abwesenheit einer Versorgung mit Blutgefäßen im Knorpelgewebe können jedoch keine Immunzellen zur Einleitung von Immunreaktionen in die Defektregionen einwandern. Eine

lokale rAAV Applikation während einer Arthrotomie (*versus* intraartikuläre Injektion) kann immunologische Reaktionen zusätzlich minimieren, weshalb dieses Verfahren in relevanten Studien bevorzugt angewendet wird<sup>222,223</sup>. In keiner der durchgeführten *in vivo* Studien der Arbeitsgruppe wurde bisher eine Immunreaktion auf rAAV Behandlung nachgewiesen. Eine Überführung der hier vorgestellten Therapieansätze in *in vivo* Experimente ist somit auf ethischer Ebene bezüglich der Risiken einer Gentherapie unbedenklich.

Von großer Bedeutung sind die Invasivität und das Risiko bei der Entnahme von Knochenmark, wodurch der Bedarf an ähnlich ertragreichen, aber weniger invasiven MSZ Quellen entsteht. Literaturangaben zufolge stellt in diesem Zusammenhang peripheres Blut eine leichter zugängliche und weniger problembehaftete Alternative dar<sup>72,232-235</sup>. Obwohl der Anteil an mesenchymalen Stammzellen im Blut (engl.: *Peripheral Blood* MSZ – PB-MSZ) noch deutlich geringer als im Knochenmark ist ( $\sim 0,0002\%^{72}$ ) und die Extraktion kein leichtes Verfahren darstellt, konnte bereits in mehreren Spezies eine erfolgreiche Isolation nachgewiesen<sup>235-239</sup> und in die Klinik überführt werden<sup>240-242</sup>. Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, dass der Einfluss der biologischen Umgebung von MSZ eine große Rolle für die Anwendung im Bereich der Knorpelreparatur spielt und TGF- $\beta$  als effizienteres therapeutisches Gen identifiziert wurde, wurde als weiterführendes Projekt die genetische Manipulation vollständiger Blutaspirate mit TGF- $\beta$  durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigten (Frisch *et al.*, eingereicht in *Stem Cells Transl Med*, Stand Juli 2016: in Revision), dass rAAV Vektoren im Blut über einen langen Zeitraum (bis zu 63 Tage) erfolgreiche Transgenexpression induzieren können, wobei die Anwendung der Vektoren keine zytotoxischen Effekte auf die Blutaspirate aufwies. Die TGF- $\beta$  Überexpression führte weiterhin zur Stimulation der proliferativen und chondrogenen Eigenschaften der Proben, jedoch wurden in diesem Ansatz zusätzlich Prozesse der Hypertrophie und Osteogenese infolge des Gentransfers verstärkt. Diese Erkenntnisse stehen in starkem Kontrast zu den Versuchen mit Knochenmarkaspiraten, wo die TGF- $\beta$  Überexpression zur Reduktion solcher Prozesse führte (IV.) Es ist also davon auszugehen, dass die biologische Umgebung des Knochenmarks wichtige Faktoren beinhaltet, die für diese Effekte verantwortlich sind und weder in isolierten MSZ noch im peripheren Blut vorhanden sind. Eine genaue Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege ist daher von großer Bedeutung.

***Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit vielversprechende Einblicke in experimentelle Grundlagen der Knorpelreparatur. Sie bietet durch den therapeutischen Ansatz eine Basis, auf der viele weiterführende Studien durchgeführt werden können, die letztlich zur Verbesserung der vorhandenen Therapieoptionen von Knorpelverletzungen beitragen können.***

#### 4. Referenzen

- 1 P. Orth, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, H. Madry and M. Cucchiariini (2014). Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 7: 1-17.
- 2 H. Madry and M. Cucchiariini (2016). Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation. *Expert Opin Biol Ther* 16(3): 331-346.
- 3 M. Cucchiariini and H. Madry (2010). Genetic modification of mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Biomed Mater Eng* 20(3): 135-143.
- 4 J. Frisch, J. K. Venkatesan, A. Rey-Rico, G. Schmitt, H. Madry and M. Cucchiariini (2014). Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 5(4): 103.
- 5 J. Frisch, J. K. Venkatesan, A. Rey-Rico, G. Schmitt, H. Madry and M. Cucchiariini (2014). Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor-beta via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 25(12): 1050-1060.
- 6 M. Brittberg, A. Imhoff, H. Madry and B. Mandelbaum (2008). Cartilage Repair: Current Concepts in Orthopaedics. *DJO Publications*.
- 7 A. J. Sophia Fox, A. Bedi and S. A. Rodeo (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1(6): 461-468.
- 8 H. Madry, C. N. van Dijk and M. Mueller-Gerbl (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18(4): 419-433.
- 9 J. Frisch and M. Cucchiariini (2016). Gene- and Stem Cell-Based Approaches to Regulate Hypertrophic Differentiation in Articular Cartilage Disorders. *Stem Cells Dev*.
- 10 S. L. Carney and H. Muir (1988). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev* 68(3): 858-910.
- 11 J. D. Esko, K. Kimata and U. Lindahl (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko et al. Cold Spring Harbor (NY).
- 12 P. J. Roughley (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 12: 92-101.
- 13 J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, B. Häcker, A. Held, C. Lange, . . . N. Zellerhoff (2009). Stryer Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- 14 P. Fratzl (2008). Collagen : structure and mechanics. *Springer Science + Business Media*.
- 15 J. Frisch, J. K. Venkatesan, A. Rey-Rico, H. Madry and M. Cucchiariini (2015). Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther* 10(2): 121-131.
- 16 M. Cucchiariini, H. Madry, F. Guilak, D. B. Saris, M. J. Stoddart, M. Koon Wong and P. Roughley (2014). A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 27: 12-16.
- 17 F. Shapiro, S. Koide and M. J. Glimcher (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75(4): 532-553.

- 18 A. H. Gomoll, H. Madry, G. Knutsen, N. van Dijk, R. Seil, M. Brittberg and E. Kon (2010). The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 18(4): 434-447.
- 19 J. Frisch, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry and M. Cucchiari (2015). Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I. Tissue Eng Part A 21(17-18): 2460-2471.
- 20 G. Knutsen, L. Engebretsen, T. C. Ludvigsen, J. O. Drogset, T. Grontvedt, E. Solheim, . . . O. Johansen (2004). Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. J Bone Joint Surg Am 86-A(3): 455-464.
- 21 U. Horas, D. Pelinkovic, G. Herr, T. Aigner and R. Schnettler (2003). Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. J Bone Joint Surg Am 85-A(2): 185-192.
- 22 M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson and L. Peterson (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331(14): 889-895.
- 23 A. K. Dewan, M. A. Gibson, J. H. Elisseeff and M. E. Trice (2014). Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. Biomed Res Int 2014: 272481.
- 24 C. O. Tibesku, T. Szuwart, T. O. Kleffner, P. M. Schlegel, U. R. Jahn, H. Van Aken and S. Fuchs (2004). Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. J Orthop Res 22(6): 1210-1214.
- 25 K. von der Mark, V. Gauss, H. von der Mark and P. Muller (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature 267(5611): 531-532.
- 26 P. D. Benya, S. R. Padilla and M. E. Nimni (1977). The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis. Biochemistry 16(5): 865-872.
- 27 L. Orozco, A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, . . . J. Garcia-Sancho (2013). Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. Transplantation 95(12): 1535-1541.
- 28 S. Wakitani, T. Mitsuoka, N. Nakamura, Y. Toritsuka, Y. Nakamura and S. Horibe (2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. Cell Transplant 13(5): 595-600.
- 29 B. Johnstone and J. U. Yoo (1999). Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S156-162.
- 30 A. M. Mackay, S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester and M. F. Pittenger (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. Tissue Eng 4(4): 415-428.
- 31 R. Mafi, S. Hindocha, P. Mafi, M. Griffin and W. S. Khan (2011). Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. Open Orthop J 5 Suppl 2: 242-248.
- 32 F. P. Barry and J. M. Murphy (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 36(4): 568-584.

- 33 C. Fu, Z. Yan, H. Xu, C. Zhang, Q. Zhang, A. Wei, . . . Y. Wang (2015). Isolation, identification and differentiation of human embryonic cartilage stem cells. *Cell Biol Int* 39(7): 777-787.
- 34 T. Olee, S. P. Grogan, M. K. Lotz, C. W. Colwell, Jr., D. D. D'Lima and E. Y. Snyder (2014). Repair of cartilage defects in arthritic tissue with differentiated human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 20(3-4): 683-692.
- 35 A. M. Craft, N. Ahmed, J. S. Rockel, G. S. Baht, B. A. Alman, R. A. Kandel, . . . G. M. Keller (2013). Specification of chondrocytes and cartilage tissues from embryonic stem cells. *Development* 140(12): 2597-2610.
- 36 J. R. Perera, P. K. Jaiswal, W. S. Khan and A. Adesida (2012). Embryonic versus mesenchymal stem cells in cartilage repair. *J Stem Cells* 7(2): 105-111.
- 37 W. S. Toh, E. H. Lee and T. Cao (2011). Potential of human embryonic stem cells in cartilage tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 7(3): 544-559.
- 38 B. Rossi, B. Merlo, S. Colleoni, E. Iacono, P. L. Tazzari, F. Ricci, . . . C. Galli (2014). Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. *Stem Cell Rev* 10(5): 712-724.
- 39 M. Baghaban Eslaminejad and S. Jahangir (2012). Amniotic fluid stem cells and their application in cell-based tissue regeneration. *Int J Fertil Steril* 6(3): 147-156.
- 40 A. Preitschopf, H. Zwickl, K. Li, G. Lubec, G. Joo, M. Rosner, . . . M. Mikula (2012). Chondrogenic differentiation of amniotic fluid stem cells and their potential for regenerative therapy. *Stem Cell Rev* 8(4): 1267-1274.
- 41 P. De Coppi, G. Bartsch, Jr., M. M. Siddiqui, T. Xu, C. C. Santos, L. Perin, . . . A. Atala (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 25(1): 100-106.
- 42 M. E. Klontzas, E. I. Kenanidis, M. Heliotis, E. Tsiridis and A. Mantalaris (2015). Bone and cartilage regeneration with the use of umbilical cord mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther* 15(11): 1541-1552.
- 43 A. M. Ibrahim, N. M. Elgharabawi, M. M. Makhoul and O. Y. Ibrahim (2015). Chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Microsc Res Tech* 78(8): 667-675.
- 44 Y. B. Park, M. Song, C. H. Lee, J. A. Kim and C. W. Ha (2015). Cartilage repair by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells with different hydrogels in a rat model. *J Orthop Res* 33(11): 1580-1586.
- 45 Y. B. Park, S. Seo, J. A. Kim, J. C. Heo, Y. C. Lim and C. W. Ha (2015). Effect of chondrocyte-derived early extracellular matrix on chondrogenesis of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* 10(3): 035014.
- 46 F. Li, Y. Z. Chen, Z. N. Miao, S. Y. Zheng and J. Jin (2012). Human placenta-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin biomaterial in the repair of articular cartilage defects. *Cell Reprogram* 14(4): 334-341.
- 47 U. G. Longo, M. Loppini, A. Berton, L. La Verde, W. S. Khan and V. Denaro (2012). Stem cells from umbilical cord and placenta for musculoskeletal tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther* 7(4): 272-281.
- 48 K. Rector, Y. Liu and G. Van Zant (2013). Comprehensive hematopoietic stem cell isolation methods. *Methods Mol Biol* 976: 1-15.

- 49 L. Rossi, G. A. Challen, O. Sirin, K. K. Lin and M. A. Goodell (2011). Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol* 750: 47-59.
- 50 S. Grassel and N. Ahmed (2007). Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci* 12: 4946-4956.
- 51 N. Malik and M. S. Rao (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol Biol* 997: 23-33.
- 52 D. Subramanyam, S. Lamouille, R. L. Judson, J. Y. Liu, N. Bucay, R. Derynck and R. Blelloch (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29(5): 443-448.
- 53 L. Warren, P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, . . . D. J. Rossi (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5): 618-630.
- 54 N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki and M. Hasegawa (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8): 348-362.
- 55 E. P. Papapetrou, M. J. Tomishima, S. M. Chambers, Y. Mica, E. Reed, J. Menon, . . . M. Sadelain (2009). Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12759-12764.
- 56 K. Okita, M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903): 949-953.
- 57 M. Stadtfeld, M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir and K. Hochedlinger (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903): 945-949.
- 58 M. C. Fisher, D. Ferrari, Y. Li, J. B. Shepard, S. E. Patterson, N. Anderson and C. N. Dealy (2012). The Potential of Human Embryonic Stem Cells for Articular Cartilage Repair and Osteoarthritis Treatment. *Rheumatol Curr Res*: S3 - 004.
- 59 P. C. Schiller and G. D'Ippolito (2009). Adult and Embryonic Stem Cells in Cartilage Repair. *Curr Rheum Rev* 5(1): 15-23.
- 60 M. Cucchiaroni, J. K. Venkatesan, M. Ekici, G. Schmitt and H. Madry (2012). Human mesenchymal stem cells overexpressing therapeutic genes: from basic science to clinical applications for articular cartilage repair. *Biomed Mater Eng* 22(4): 197-208.
- 61 E. L. Fong, C. K. Chan and S. B. Goodman (2011). Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials* 32(2): 395-409.
- 62 A. I. Caplan and J. E. Dennis (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98(5): 1076-1084.
- 63 S. Aggarwal and M. F. Pittenger (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4): 1815-1822.
- 64 M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, . . . D. R. Marshak (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411): 143-147.

- 65 A. I. Caplan (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5): 641-650.
- 66 M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, . . . E. Horwitz (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.
- 67 E. M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, . . . T. International Society for Cellular (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7(5): 393-395.
- 68 L. Peng, Z. Jia, X. Yin, X. Zhang, Y. Liu, P. Chen, . . . C. Zhou (2008). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 17(4): 761-773.
- 69 C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44(8): 1928-1942.
- 70 S. W. O'Driscoll, A. D. Recklies and A. R. Poole (1994). Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study. *J Bone Joint Surg Am* 76(7): 1042-1051.
- 71 C. M. Digirolamo, D. Stokes, D. Colter, D. G. Phinney, R. Class and D. J. Prockop (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107(2): 275-281.
- 72 W. L. Fu, C. Y. Zhou and J. K. Yu (2014). A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med* 42(3): 592-601.
- 73 C. W. McIlwraith, D. D. Frisbie, W. G. Rodkey, J. D. Kisiday, N. M. Werpy, C. E. Kawcak and J. R. Steadman (2011). Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy* 27(11): 1552-1561.
- 74 B. Grigolo, G. Lisignoli, G. Desando, C. Cavallo, E. Marconi, M. Tschon, . . . A. Facchini (2009). Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit. *Tissue Eng Part C Methods* 15(4): 647-658.
- 75 J. M. Murphy, D. J. Fink, E. B. Hunziker and F. P. Barry (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(12): 3464-3474.
- 76 S. Wakitani, T. Goto, S. J. Pineda, R. G. Young, J. M. Mansour, A. I. Caplan and V. M. Goldberg (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76(4): 579-592.
- 77 K. L. Wong, K. B. Lee, B. C. Tai, P. Law, E. H. Lee and J. H. Hui (2013). Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy* 29(12): 2020-2028.
- 78 K. B. Lee, V. T. Wang, Y. H. Chan and J. H. Hui (2012). A novel, minimally-invasive technique of cartilage repair in the human knee using arthroscopic microfracture and injections of mesenchymal stem cells and hyaluronic acid--a prospective comparative study on safety and short-term efficacy. *Ann Acad Med Singapore* 41(11): 511-517.
- 79 C. Kasemkijwattana, S. Hongeng, S. Kesprayura, V. Rungsinaporn, K. Chaipinyo and K. Chansiri (2011). Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: two cases report. *J Med Assoc Thai* 94(3): 395-400.

- 80 H. Nejadnik, J. H. Hui, E. P. Feng Choong, B. C. Tai and E. H. Lee (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 38(6): 1110-1116.
- 81 R. Kuroda, K. Ishida, T. Matsumoto, T. Akisue, H. Fujioka, K. Mizuno, . . . M. Kurosaka (2007). Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15(2): 226-231.
- 82 M. Emadeddin, N. Aghdami, L. Taghiyar, R. Fazeli, R. Moghadasali, S. Jahangir, . . . M. Baghaban Eslaminejad (2012). Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Arch Iran Med* 15(7): 422-428.
- 83 F. Davatchi, B. S. Abdollahi, M. Mohyeddin, F. Shahram and B. Nikbin (2011). Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 14(2): 211-215.
- 84 C. J. Centeno, D. Busse, J. Kisiday, C. Keohan, M. Freeman and D. Karli (2008). Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 11(3): 343-353.
- 85 M. Cucchiari, M. Ekici, S. Schetting, D. Kohn and H. Madry (2011). Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17(15-16): 1921-1933.
- 86 J. D. Kim, G. W. Lee, G. H. Jung, C. K. Kim, T. Kim, J. H. Park, . . . Y. B. You (2014). Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 24(8): 1505-1511.
- 87 A. Gigante, S. Cecconi, S. Calcagno, A. Busilacchi and D. Enea (2012). Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech* 1(2): e175-180.
- 88 J. Skowronski, R. Skowronski and M. Rutka (2013). Large cartilage lesions of the knee treated with bone marrow concentrate and collagen membrane--results. *Ortop Traumatol Rehabil* 15(1): 69-76.
- 89 K. Slynarski, J. Deszczynski and J. Karpinski (2006). Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplant Proc* 38(1): 318-319.
- 90 C. M. Kolf, E. Cho and R. S. Tuan (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9(1): 204.
- 91 K. Anam and T. A. Davis (2013). Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations. *Stem Cell Res Ther* 4(5): 112.
- 92 D. P. Lennon, S. E. Haynesworth, D. M. Arm, M. A. Baber and A. I. Caplan (2000). Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn* 219(1): 50-62.
- 93 A. M. DeLise, L. Fischer and R. S. Tuan (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8(5): 309-334.
- 94 B. E. Bobick, F. H. Chen, A. M. Le and R. S. Tuan (2009). Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87(4): 351-371.



- 95 M. B. Goldring, K. Tsuchimochi and K. Ijiri (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97(1): 33-44.
- 96 L. Shum, C. M. Coleman, Y. Hatakeyama and R. S. Tuan (2003). Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2): 102-122.
- 97 N. J. Hickok, A. R. Haas and R. S. Tuan (1998). Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech* 43(2): 174-190.
- 98 D. J. Kelly and C. R. Jacobs (2010). The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90(1): 75-85.
- 99 M. Kondo, K. Yamaoka and Y. Tanaka (2014). Acquiring chondrocyte phenotype from human mesenchymal stem cells under inflammatory conditions. *Int J Mol Sci* 15(11): 21270-21285.
- 100 I. Onyekwelu, M. B. Goldring and C. Hidaka (2009). Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. *J Cell Biochem* 107(3): 383-392.
- 101 D. Studer, C. Millan, E. Ozturk, K. Maniura-Weber and M. Zenobi-Wong (2012). Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 24: 118-135; discussion 135.
- 102 A. A. Pitsillides and F. Beier (2011). Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol* 7(11): 654-663.
- 103 M. Cucchiari (2009). Adeno-Associated Viral Vectors. *Gene Ther Rev* 1(1).
- 104 H. Madry, P. Orth and M. Cucchiari (2011). Gene Therapy for Cartilage Repair. *Cartilage* 2(3): 201-225.
- 105 S. A. Rosenberg, P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R. A. Morgan, R. Moen, . . . et al. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323(9): 570-578.
- 106 C. H. Evans, S. C. Ghivizzani and P. D. Robbins (2008). Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Res Ther* 10(3): 110.
- 107 T. Flotte, B. Carter, C. Conrad, W. Guggino, T. Reynolds, B. Rosenstein, . . . R. Wetzel (1996). A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 7(9): 1145-1159.
- 108 C. S. Manno, A. J. Chew, S. Hutchison, P. J. Larson, R. W. Herzog, V. R. Arruda, . . . B. Glader (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101(8): 2963-2972.
- 109 M. S. Weinberg, R. J. Samulski and T. J. McCown (2013). Adeno-associated virus (AAV) gene therapy for neurological disease. *Neuropharmacology* 69: 82-88.
- 110 G. Mittermeyer, C. W. Christine, K. H. Rosenbluth, S. L. Baker, P. Starr, P. Larson, . . . K. S. Bankiewicz (2012). Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 23(4): 377-381.
- 111 R. E. MacLaren, M. Groppe, A. R. Barnard, C. L. Cottrill, T. Tolmachova, L. Seymour, . . . M. C. Seabra (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 383(9923): 1129-1137.

- 112 J. R. Mendell, L. R. Rodino-Klapac, X. Rosales-Quintero, J. Kota, B. D. Coley, G. Galloway, . . . K. R. Clark (2009). Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol* 66(3): 290-297.
- 113 P. J. Mease, N. Wei, E. J. Fudman, A. J. Kivitz, J. Schechtman, R. G. Trapp, . . . A. E. Heald (2010). Safety, tolerability, and clinical outcomes after intraarticular injection of a recombinant adeno-associated vector containing a tumor necrosis factor antagonist gene: results of a phase 1/2 Study. *J Rheumatol* 37(4): 692-703.
- 114 P. Wehling, J. Reinecke, A. W. Baltzer, M. Granrath, K. P. Schulitz, C. Schultz, . . . C. H. Evans (2009). Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 20(2): 97-101.
- 115 P. J. Mease, K. Hobbs, A. Chalmers, H. El-Gabalawy, A. Bookman, E. Keystone, . . . A. E. Heald (2009). Local delivery of a recombinant adenoassociated vector containing a tumour necrosis factor alpha antagonist gene in inflammatory arthritis: a phase 1 dose-escalation safety and tolerability study. *Ann Rheum Dis* 68(8): 1247-1254.
- 116 C. H. Evans, P. D. Robbins, S. C. Ghivizzani, J. H. Herndon, R. Kang, A. B. Bahnson, . . . T. M. Wright (1996). Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 7(10): 1261-1280.
- 117 R. K. Elmallah, J. J. Cherian, J. J. Jauregui, T. P. Pierce, W. B. Beaver and M. A. Mont (2015). Genetically modified chondrocytes expressing TGF-beta1: a revolutionary treatment for articular cartilage damage? *Expert Opin Biol Ther* 15(3): 455-464.
- 118 C. H. Evans, S. C. Ghivizzani and P. D. Robbins (2013). Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. *Transl Res* 161(4): 205-216.
- 119 C. W. Ha, M. J. Noh, K. B. Choi and K. H. Lee (2012). Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in degenerative arthritis patients. *Cytotherapy* 14(2): 247-256.
- 120 J. M. Wilson (2005). Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther* 16(9): 1014-1015.
- 121 S. Yla-Herttuala (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 20(10): 1831-1832.
- 122 S. E. Raper, N. Chirmule, F. S. Lee, N. A. Wivel, A. Bagg, G. P. Gao, . . . M. L. Batshaw (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80(1-2): 148-158.
- 123 S. Hacein-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, . . . A. Fischer (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348(3): 255-256.
- 124 M. C. Lee, C. W. Ha, R. K. Elmallah, J. J. Cherian, J. J. Cho, T. W. Kim, . . . M. A. Mont (2015). A placebo-controlled randomised trial to assess the effect of TGF-ss1-expressing chondrocytes in patients with arthritis of the knee. *Bone Joint J* 97-B(7): 924-932.
- 125 C. W. Ha, J. J. Cho, R. K. Elmallah, J. J. Cherian, T. W. Kim, M. C. Lee and M. A. Mont (2015). A Multicenter, Single-Blind, Phase IIa Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell-Mediated Gene Therapy in Degenerative Knee Arthritis Patients. *Hum Gene Ther Clin Dev* 26(2): 125-130.

- 126 H. Haleem-Smith, R. Calderon, Y. Song, R. S. Tuan and F. H. Chen (2012). Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 113(4): 1245-1252.
- 127 A. J. Neumann, M. Alini, C. W. Archer and M. J. Stoddart (2013). Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A* 19(11-12): 1285-1294.
- 128 W. Bocker, Z. Yin, I. Drosse, F. Haasters, O. Rossmann, M. Wierer, . . . M. Schieker (2008). Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* 12(4): 1347-1359.
- 129 J. K. Venkatesan, M. Ekici, H. Madry, G. Schmitt, D. Kohn and M. Cucchiari (2012). SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 3(3): 22.
- 130 H. J. Kim and G. I. Im (2011). Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 20(12): 2103-2114.
- 131 J. H. Kim, J. S. Park, H. N. Yang, D. G. Woo, S. Y. Jeon, H. J. Do, . . . K. H. Park (2011). The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials* 32(1): 268-278.
- 132 J. C. Babister, R. S. Tare, D. W. Green, S. Inglis, S. Mann and R. O. Oreffo (2008). Genetic manipulation of human mesenchymal progenitors to promote chondrogenesis using "bead-in-bead" polysaccharide capsules. *Biomaterials* 29(1): 58-65.
- 133 T. Ikeda, S. Kamekura, A. Mabuchi, I. Kou, S. Seki, T. Takato, . . . U. I. Chung (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50(11): 3561-3573.
- 134 T. M. Liu, X. M. Guo, H. S. Tan, J. H. Hui, B. Lim and E. H. Lee (2011). Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* 63(9): 2711-2720.
- 135 A. F. Steinert, M. Weissenberger, M. Kunz, F. Gilbert, S. C. Ghivizzani, S. Gobel, . . . M. Rudert (2012). Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 14(4): R168.
- 136 T. M. Liu, W. M. Ng, H. S. Tan, D. Vinitha, Z. Yang, J. B. Fan, . . . B. Lim (2013). Molecular basis of immortalization of human mesenchymal stem cells by combination of p53 knockdown and human telomerase reverse transcriptase overexpression. *Stem Cells Dev* 22(2): 268-278.
- 137 S. Y. Jeon, J. S. Park, H. N. Yang, D. G. Woo and K. H. Park (2012). Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* 33(17): 4413-4423.
- 138 J. Huang, L. Zhao, L. Xing and D. Chen (2010). MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 28(2): 357-364.
- 139 L. Cao, F. Yang, G. Liu, D. Yu, H. Li, Q. Fan, . . . K. Dai (2011). The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32(16): 3910-3920.

- 140 B. Hu, J. L. Ren, J. R. Zhang, Q. Ma, Y. P. Liu and T. Q. Mao (2010). Enhanced treatment of articular cartilage defect of the knee by intra-articular injection of Bcl-xL-engineered mesenchymal stem cells in rabbit model. *J Tissue Eng Regen Med* 4(2): 105-114.
- 141 R. Katayama, S. Wakitani, N. Tsumaki, Y. Morita, I. Matsushita, R. Gejo and T. Kimura (2004). Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford)* 43(8): 980-985.
- 142 J. Park, K. Gelse, S. Frank, K. von der Mark, T. Aigner and H. Schneider (2006). Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med* 8(1): 112-125.
- 143 X. Zhang, Z. Zheng, P. Liu, Y. Ma, L. Lin, N. Lang, . . . Y. Ao (2008). The synergistic effects of microfracture, perforated decalcified cortical bone matrix and adenovirus-bone morphogenetic protein-4 in cartilage defect repair. *Biomaterials* 29(35): 4616-4629.
- 144 S. Zhu, B. Zhang, C. Man, Y. Ma, X. Liu and J. Hu (2014). Combined effects of connective tissue growth factor-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells and NaOH-treated PLGA scaffolds on the repair of articular cartilage defect in rabbits. *Cell Transplant* 23(6): 715-727.
- 145 J. T. Sieker, M. Kunz, M. Weissenberger, F. Gilbert, S. Frey, M. Rudert and A. F. Steinert (2015). Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates. *Osteoarthritis Cartilage* 23(3): 433-442.
- 146 A. Ivkovic, A. Pascher, D. Hudetz, D. Maticic, M. Jelic, S. Dickinson, . . . M. Pecina (2010). Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther* 17(6): 779-789.
- 147 A. Pascher, G. D. Palmer, A. Steinert, T. Oligino, E. Gouze, J. N. Gouze, . . . S. C. Ghivizzani (2004). Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* 11(2): 133-141.
- 148 A. Rey-Rico, J. Frisch, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry and M. Cucchiari (2015). Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther* 22(1): 50-57.
- 149 M. A. Goncalves (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 2: 43.
- 150 R. W. Atchison, B. C. Casto and W. M. Hammon (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149(3685): 754-756.
- 151 M. D. Weitzman and R. M. Linden (2011). Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807: 1-23.
- 152 R. O. Snyder and T. R. Flotte (2002). Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* 13(5): 418-423.
- 153 M. Cucchiari (2011). Regenerative Therapy for the Musculoskeletal System Using Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. *Research Signpost*.
- 154 A. Donsante, D. G. Miller, Y. Li, C. Vogler, E. M. Brunt, D. W. Russell and M. S. Sands (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* 317(5837): 477.
- 155 R. J. Chandler, M. C. LaFave, G. K. Varshney, N. S. Trivedi, N. Carrillo-Carrasco, J. S. Senac, . . . C. P. Venditti (2015). Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest* 125(2): 870-880.

- 156 D. W. Russell and M. Grompe (2015). Adeno-associated virus finds its disease. *Nat Genet* 47(10): 1104-1105.
- 157 J. C. Nault, S. Datta, S. Imbeaud, A. Franconi, M. Mallet, G. Couchy, . . . J. Zucman-Rossi (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 47(10): 1187-1193.
- 158 M. Schmidt, S. Afione and R. M. Kotin (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol* 74(20): 9441-9450.
- 159 C. Berthet, K. Raj, P. Saudan and P. Beard (2005). How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(38): 13634-13639.
- 160 W. Ding, L. Zhang, Z. Yan and J. F. Engelhardt (2005). Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12(11): 873-880.
- 161 S. Pillay, N. L. Meyer, A. S. Puschnik, O. Davulcu, J. Diep, Y. Ishikawa, . . . J. E. Carette (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530(7588): 108-112.
- 162 Z. Wu, A. Asokan and R. J. Samulski (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14(3): 316-327.
- 163 B. J. Carter (1992). Adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* 3(5): 533-539.
- 164 M. Urabe, K. Kogure, A. Kume, Y. Sato, K. Tobita and K. Ozawa (2003). Positive and negative effects of adeno-associated virus Rep on AAVS1-targeted integration. *J Gen Virol* 84(Pt 8): 2127-2132.
- 165 R. H. Smith (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15(11): 817-822.
- 166 R. M. Linden, P. Ward, C. Giraud, E. Winocour and K. I. Berns (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21): 11288-11294.
- 167 C. Mülhardt (2013). Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics. *Springer Berlin Heidelberg*.
- 168 R. J. Samulski, L. S. Chang and T. Shenk (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63(9): 3822-3828.
- 169 R. J. Samulski, L. S. Chang and T. Shenk (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61(10): 3096-3101.
- 170 L. Dente, G. Cesareni and R. Cortese (1983). pEMBL: a new family of single stranded plasmids. *Nucleic Acids Res* 11(6): 1645-1655.
- 171 H. Madry, M. Cucchiaroni, E. F. Terwilliger and S. B. Trippel (2003). Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther* 14(4): 393-402.
- 172 D. R. Deyle and D. W. Russell (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* 11(4): 442-447.
- 173 E. Himpe and R. Kooijman (2009). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 35(1): 76-81.

- 174 D. D. Bikle and Y. Wang (2011). Insulin-like growth factor-I and bone. *JBMS BoneKEY* 8: 328–341.
- 175 L. Heron-Milhavet, M. Karas, C. M. Goldsmith, B. J. Baum and D. LeRoith (2001). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor activation rescues UV-damaged cells through a p38 signaling pathway. Potential role of the IGF-I receptor in DNA repair. *J Biol Chem* 276(21): 18185-18192.
- 176 E. J. Gallagher, Y. Fierz, R. D. Ferguson and D. LeRoith (2010). The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. *Endocr Pract* 16(5): 864-873.
- 177 L. Danisovic, I. Varga and S. Polak (2012). Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 44(2): 69-73.
- 178 Y. Wang, D. D. Bikle and W. Chang (2013). Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. *Bone Res* 1(3): 249-259.
- 179 A. W. James (2013). Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)* 2013: 684736.
- 180 M. Wabitsch, H. Hauner, E. Heinze and W. M. Teller (1995). The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation. *Metabolism* 44(10 Suppl 4): 45-49.
- 181 S. J. Yang, C. Y. Chen, G. D. Chang, H. C. Wen, C. Y. Chen, S. C. Chang, . . . C. H. Chang (2013). Activation of Akt by advanced glycation end products (AGEs): involvement of IGF-1 receptor and caveolin-1. *PLoS One* 8(3): e58100.
- 182 I. Garza-Veloz, V. J. Romero-Diaz, M. L. Martinez-Fierro, I. A. Marino-Martinez, M. Gonzalez-Rodriguez, H. G. Martinez-Rodriguez, . . . A. Rojas-Martinez (2013). Analyses of chondrogenic induction of adipose mesenchymal stem cells by combined co-stimulation mediated by adenoviral gene transfer. *Arthritis Res Ther* 15(4): R80.
- 183 G. D. Palmer, A. Steinert, A. Pascher, E. Gouze, J. N. Gouze, O. Betz, . . . S. C. Ghivizzani (2005). Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12(2): 219-228.
- 184 K. Kawamura, C. R. Chu, S. Sobajima, P. D. Robbins, F. H. Fu, N. J. Izzo and C. Niyibizi (2005). Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol* 33(8): 865-872.
- 185 R. Govinden and K. D. Bhoola (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98(2): 257-265.
- 186 W. Wang, D. Rigueur and K. M. Lyons (2014). TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102(1): 37-51.
- 187 H. Taipaleenmäki (2010). Factors regulating chondrogenic differentiation. Thesis. *University of Turku*.
- 188 X. Cao, W. Deng, Y. Wei, Y. Yang, W. Su, Y. Wei, . . . J. Yu (2012). Incorporating pTGF-beta1/calcium phosphate nanoparticles with fibronectin into 3-dimensional collagen/chitosan scaffolds: efficient, sustained gene delivery to stem cells for chondrogenic differentiation. *Eur Cell Mater* 23: 81-93.
- 189 C. X. He, N. Li, Y. L. Hu, X. M. Zhu, H. J. Li, M. Han, . . . J. Q. Gao (2011). Effective gene delivery to mesenchymal stem cells based on the reverse transfection and three-dimensional cell culture system. *Pharm Res* 28(7): 1577-1590.

- 190 W. Xia, Y. Q. Jin, J. D. Kretlow, W. Liu, W. Ding, H. Sun, . . . Y. Cao (2009). Adenoviral transduction of hTGF-beta1 enhances the chondrogenesis of bone marrow derived stromal cells. *Biotechnol Lett* 31(5): 639-646.
- 191 A. F. Steinert, G. D. Palmer, C. Pilapil, U. Noth, C. H. Evans and S. C. Ghivizzani (2009). Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A* 15(5): 1127-1139.
- 192 C. X. He, T. Y. Zhang, P. H. Miao, Z. J. Hu, M. Han, Y. Tabata, . . . J. Q. Gao (2012). TGF-beta1 gene-engineered mesenchymal stem cells induce rat cartilage regeneration using nonviral gene vector. *Biotechnol Appl Biochem* 59(3): 163-169.
- 193 X. Guo, Q. Zheng, S. Yang, Z. Shao, Q. Yuan, Z. Pan, . . . D. Quan (2006). Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater* 1(4): 206-215.
- 194 M. R. Pagnotto, Z. Wang, J. C. Karpie, M. Ferretti, X. Xiao and C. R. Chu (2007). Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 14(10): 804-813.
- 195 H. Ito, J. J. Goater, P. Tiyyapatanaputi, P. T. Rubery, R. J. O'Keefe and E. M. Schwarz (2004). Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 11(1): 34-41.
- 196 H. H. Lee, A. M. Haleem, V. Yao, J. Li, X. Xiao and C. R. Chu (2011). Release of bioactive adeno-associated virus from fibrin scaffolds: effects of fibrin glue concentrations. *Tissue Eng Part A* 17(15-16): 1969-1978.
- 197 K. Hata, R. Nishimura, F. Ikeda, K. Yamashita, T. Matsubara, T. Nokubi and T. Yoneda (2003). Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* 14(2): 545-555.
- 198 S. Stender, M. Murphy, T. O'Brien, C. Stengaard, M. Ulrich-Vinther, K. Soballe and F. Barry (2007). Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 13: 93-99; discussion 99.
- 199 D. S. Anson and M. Limberis (2004). An improved beta-galactosidase reporter gene. *J Biotechnol* 108(1): 17-30.
- 200 A. Weimer, H. Madry, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, J. Frisch, A. Wezel, . . . M. Cucchiari (2012). Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulinlike growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med* 18: 346-358.
- 201 L. Zhang, P. Su, C. Xu, J. Yang, W. Yu and D. Huang (2010). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett* 32(9): 1339-1346.
- 202 S. B. Trippel (1995). Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43: 129-132.
- 203 L. M. Scavo, M. Karas, M. Murray and D. Leroith (2004). Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 89(7): 3543-3553.
- 204 L. A. Fortier, J. U. Barker, E. J. Strauss, T. M. McCarrel and B. J. Cole (2011). The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 469(10): 2706-2715.

- 205 J. K. Venkatesan, A. Rey-Rico, G. Schmitt, A. Wezel, H. Madry and M. Cucchiari (2013). rAAV-mediated overexpression of TGF-beta stably restructures human osteoarthritic articular cartilage in situ. *J Transl Med* 11: 211.
- 206 H. J. Kim, Y. J. Kim and G. I. Im (2009). Is continuous treatment with transforming growth factor-beta necessary to induce chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells? *Cells Tissues Organs* 190(1): 1-10.
- 207 F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu and J. M. Murphy (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268(2): 189-200.
- 208 J. U. Yoo, T. S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A. I. Caplan, V. M. Goldberg and B. Johnstone (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 80(12): 1745-1757.
- 209 B. Grigolo, C. Cavallo, G. Desando, C. Manferdini, G. Lisignoli, A. Ferrari, . . . A. Facchini (2015). Novel nano-composite biomimetic biomaterial allows chondrogenic and osteogenic differentiation of bone marrow concentrate derived cells. *J Mater Sci Mater Med* 26(4): 173.
- 210 C. Cavallo, G. Desando, M. Columbaro, A. Ferrari, N. Zini, A. Facchini and B. Grigolo (2013). Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hylauronan scaffold: rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J Biomed Mater Res A* 101(6): 1559-1570.
- 211 H. Koch, J. A. Jadowiec and P. G. Campbell (2005). Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14(6): 621-631.
- 212 W. Wu, Y. Dan, S. H. Yang, C. Yang, Z. W. Shao, W. H. Xu, . . . D. Zheng (2013). Promotion of chondrogenesis of marrow stromal stem cells by TGF-beta3 fusion protein in vivo. [corrected]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 33(5): 692-699.
- 213 C. An, Y. Cheng, Q. Yuan and J. Li (2010). IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng* 38(4): 1647-1654.
- 214 J. Hao, Y. Yao, R. R. Varshney, L. Wang, C. Prakash, H. Li and D. A. Wang (2008). Gene transfer and living release of transforming growth factor-beta3 for cartilage tissue engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods* 14(4): 273-280.
- 215 W. G. Wang, S. Q. Lou, X. D. Ju, K. Xia and J. H. Xia (2003). In vitro chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in monolayer culture: activation by transfection with TGF-beta2. *Tissue Cell* 35(1): 69-77.
- 216 K. Gelse, K. von der Mark, T. Aigner, J. Park and H. Schneider (2003). Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 48(2): 430-441.
- 217 A. J. Nixon, B. D. Brower-Toland, S. J. Bent, R. A. Saxer, M. J. Wilke, P. D. Robbins and C. H. Evans (2000). Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*(379 Suppl): S201-213.
- 218 K. Gelse, C. Muhle, K. Knaup, B. Swoboda, M. Wiesener, F. Hennig, . . . H. Schneider (2008). Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1alpha activity. *Osteoarthritis Cartilage* 16(12): 1457-1465.
- 219 M. E. Bernardo, A. M. Cometa, D. Pagliara, L. Vinti, F. Rossi, R. Cristantielli, . . . F. Locatelli (2011). Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24(1): 73-81.



- 220 J. Frisch, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, G. Schmitt, H. Madry and M. Cucchiari (2016). TGF-beta gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *J Cell Mol Med* 20(3): 430-440.
- 221 D. Krause, A. Lyons, C. Fennelly and R. O'Connor (2001). Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. *J Biol Chem* 276(22): 19244-19252.
- 222 M. Cucchiari and H. Madry (2014). Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* 21(9): 811-819.
- 223 M. Cucchiari, H. Madry, C. Ma, T. Thurn, D. Zurakowski, M. D. Menger, . . . E. F. Terwilliger (2005). Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* 12(2): 229-238.
- 224 H. Madry, G. Kaul, D. Zurakowski, G. Vunjak-Novakovic and M. Cucchiari (2013). Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater* 25: 229-247.
- 225 M. Cucchiari, C. Henrionnet, D. Mainard, A. Pinzano and H. Madry (2015). New trends in articular cartilage repair. *J Exp Orthop* 2(1): 8.
- 226 A. Rey-Rico and M. Cucchiari (2016). Controlled release strategies for rAAV-mediated gene delivery. *Acta Biomater* 29: 1-10.
- 227 H. Madry, M. Ochi, M. Cucchiari, D. Pape and R. Seil (2015). Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop* 2(1): 9.
- 228 P. Orth, M. Cucchiari, G. Kaul, M. F. Ong, S. Graber, D. M. Kohn and H. Madry (2012). Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis Cartilage* 20(10): 1161-1169.
- 229 P. Orth, J. Duffner, D. Zurakowski, M. Cucchiari and H. Madry (2016). Small-Diameter Awls Improve Articular Cartilage Repair After Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *Am J Sports Med* 44(1): 209-219.
- 230 M. Eldracher, P. Orth, M. Cucchiari, D. Pape and H. Madry (2014). Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *Am J Sports Med* 42(11): 2741-2750.
- 231 A. M. Bende (2001). Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1(4): 363-376.
- 232 W. L. Fu, J. Y. Zhang, X. Fu, X. N. Duan, K. K. Leung, Z. Q. Jia, . . . J. K. Yu (2012). Comparative study of the biological characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow and peripheral blood of rats. *Tissue Eng Part A* 18(17-18): 1793-1803.
- 233 P. P. Chong, L. Selvaratnam, A. A. Abbas and T. Kamarul (2012). Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 30(4): 634-642.
- 234 M. Korbling and P. Anderlini (2001). Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98(10): 2900-2908.

- 235 N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger and R. N. Maini (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2(6): 477-488.
- 236 J. Lyahyai, D. R. Mediano, B. Ranera, A. Sanz, A. R. Remacha, R. Bolea, . . . I. Martin-Burriel (2012). Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res* 8: 169.
- 237 M. T. Valenti, L. Dalle Carbonare, L. Donatelli, F. Bertoldo, M. Zanatta and V. Lo Cascio (2008). Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43(6): 1084-1092.
- 238 Q. He, C. Wan and G. Li (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells* 25(1): 69-77.
- 239 J. Koerner, D. Nesic, J. D. Romero, W. Brehm, P. Mainil-Varlet and S. P. Grogan (2006). Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(6): 1613-1619.
- 240 J. Skowronski, R. Skowronski and M. Rutka (2012). Cartilage lesions of the knee treated with blood mesenchymal stem cells - results. *Ortop Traumatol Rehabil* 14(6): 569-577.
- 241 K. Y. Saw, A. Anz, C. Siew-Yoke Jee, S. Merican, R. Ching-Soong Ng, S. A. Roohi and K. Ragavanaidu (2013). Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood stem cells versus hyaluronic acid: a randomized controlled trial. *Arthroscopy* 29(4): 684-694.
- 242 K. Y. Saw, A. Anz, S. Merican, Y. G. Tay, K. Ragavanaidu, C. S. Jee and D. A. McGuire (2011). Articular cartilage regeneration with autologous peripheral blood progenitor cells and hyaluronic acid after arthroscopic subchondral drilling: a report of 5 cases with histology. *Arthroscopy* 27(4): 493-506.

## **5. Anhang**

### **Originalarbeiten**

Nachfolgend sind alle Publikationen aufgeführt, die in die Dissertation mit eingeschlossen wurden.

RESEARCH

Open Access

# Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Janina Frisch<sup>1</sup>, Jagadeesh Kumar Venkatesan<sup>1</sup>, Ana Rey-Rico<sup>1</sup>, Gertrud Schmitt<sup>1</sup>, Henning Madry<sup>1,2</sup> and Magali Cucchiari<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Introduction:** The transplantation of genetically modified progenitor cells such as bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) is an attractive strategy to improve the natural healing of articular cartilage defects. In the present study, we examined the potential benefits of sustained overexpression of the mitogenic and pro-anabolic insulin-like growth factor I (IGF-I) via gene transfer upon the biological activities of human MSCs (hMSCs).

**Methods:** Recombinant adeno-associated vectors (rAAV) were used to deliver a human IGF-I coding sequence in undifferentiated and chondrogenically-induced primary hMSCs in order to determine the efficacy and duration of transgene expression and the subsequent effects of the genetic modification upon the chondrogenic *versus* osteogenic differentiation profiles of the cells relative to control (*lacZ*) treatment after 21 days *in vitro*.

**Results:** Significant and prolonged expression of IGF-I was evidenced in undifferentiated and most importantly in chondrogenically-induced hMSCs transduced with the candidate rAAV-hIGF-I vector for up to 21 days, leading to enhanced proliferative, biosynthetic, and chondrogenic activities compared with rAAV-*lacZ* treatment. Overexpression of IGF-I as achieved in the conditions applied here also increased the expression of hypertrophic and osteogenic markers in the treated cells.

**Conclusions:** These results suggest that a tight regulation of rAAV expression may be necessary for further translation of the approach in clinically relevant animal models *in vivo*. However, the current findings support the concept of using this type of vector as an effective tool to treat articular cartilage defects via gene- and stem cell-based procedures.

## Introduction

Injured adult articular cartilage, the tissue that allows for smooth gliding and weight bearing on articulating surfaces, does not heal effectively by itself [1]. Due to its aneural and avascular nature and in the absence of lymphatic drainage, the articular cartilage does not have access to reparative cells that are potentially brought into nearly all other tissues in response to injury. Lesions such as

those resulting from acute trauma or degenerative osteoarthritis become persistent and progress over time [1,2]. Hyaline cartilage is formed by chondrocytes surrounded by a dense network of extracellular matrix composed of proteoglycans bound to 70 to 80% water and type II collagen and other molecules (type IX, type XI, type VI, and type XIV collagen, cartilage oligomeric matrix protein, link protein, decorin, fibromodulin, fibronectin, tenascin). Despite the availability of various pharmacological treatments and surgical interventions, reproduction of the native organization and activities in injured cartilage remains problematic [3-6] because such options promote mostly

\* Correspondence: mmcucchiari@hotmail.com

<sup>1</sup>Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University Medical Center, Kirrbergerstr. Bldg 37, D-66421 Homburg/Saar, Germany  
Full list of author information is available at the end of the article

the appearance of a fibrocartilaginous repair tissue consisting of type I collagen that does not integrate well with the surrounding cartilage and poorly withstands mechanical stress [1,6-8].

Large efforts have been made to overcome these difficulties, and the concept of treating cartilage lesions by stem cell-based therapy became an important focus of experimental and clinical research for cartilage repair – taking advantage of the chondrogenic differentiation potential and regenerative properties of such cells, including bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) [9-13]. Important limitations still hinder the use of MSCs in patients, including the large amounts of cells required for application *in vivo* and the age-related decline in lifespan, proliferation, and potency [14-17]. Gene delivery approaches offer strong tools to optimize the use of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) for cartilage repair purposes. Various therapeutic candidate sequences have been reported for their effects upon the chondrogenic differentiation of such cells, among which are cartilage oligomeric matrix protein [18], transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) [19-21], bone morphogenetic proteins [21-23], basic fibroblast growth factor (FGF-2) [24], Indian hedgehog [21], human telomerase alone [25,26] or combined with a small interfering RNA against p53 [27], the specific transcription factors of the SOX family alone [28-33] or combined with an anti-Runx2/Cbfa1 small interfering RNA [34], or the zinc-finger protein 145 [35]. Most of these studies, however, focused on the use of gene transfer vectors with relatively low or short-term efficiencies (nonviral vectors, adenoviral vectors) [18,19,21-23,28-31,33,34] or on constructs carrying the risk of insertional mutagenesis (retroviral vectors, lentiviral vectors) [25-27,35].

Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors emerged instead as more advantageous gene vehicles because they are less toxic and immunogenic due to complete removal of the adeno-associated viral vector coding sequences while allowing for very high and persistent levels of transgene expression in hMSCs by maintenance of the sequences delivered mostly under the form of stable episomes, without impairment of the differentiation potential [20,24,32]. Genetic modification of hMSCs via rAAV has so far been performed to deliver various therapeutic candidates including TGF $\beta$  [20], FGF-2 [24], and SOX9 [32], but little is known about the effects of applying insulin-like growth factor I (IGF-I) via rAAV in this clinically relevant population of regenerative cells. In the present study, we also focused on this particular growth factor in light of our previous work showing the benefits of overexpressing IGF-I via rAAV upon the remodeling of human osteoarthritic cartilage by activation of the anabolic and proliferative processes in damaged chondrocytes *in situ* [36]. Our

results demonstrate – for the first time, to our best knowledge – that chondrogenic differentiation of hMSCs can be enhanced by treatment with IGF-I, specifically when overexpressing the factor via rAAV gene transfer possibly due to the high and prolonged levels of transgene expression achieved with this class of vector compared with other less efficient gene delivery systems. Yet treatment with the current IGF-I candidate vector also led to an increased expression of hypertrophic and osteogenic markers, so tight regulation of IGF-I expression via rAAV will be critical to achieve an optimized stem cell-based, rAAV-human insulin-like growth factor I (hIGF-I)-mediated approach to treat articular cartilage defects *in vivo*.

## Methods

### Reagents

Reagents were obtained from Sigma (Munich, Germany) unless otherwise indicated. Recombinant FGF-2 and TGF $\beta$ 3 were purchased from Peprotech (Hamburg, Germany). The dimethylmethylene blue dye was from Serva (Heidelberg, Germany). The anti-IGF-I (AF-291-NA) antibody was from R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany), the anti-type-II collagen (II-II6B3) antibody from the NIH Hybridoma Bank (University of Iowa, Ames, IO, USA), the anti-type-I (AF-5610) antibody from Acris (Hiddenhausen, Germany), the anti-bromodeoxyuridine (BrdU; BU-33) and anti-type X collagen (COL-10) antibodies from Sigma, and the anti-SOX9 (C-20), anti-CD34 (C-18), anti-CD71 (C-20), and anti-CD105 (T-20) antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Biotinylated secondary antibodies and ABC reagent were obtained from Vector Laboratories (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Germany). The IGF-I enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (hIGF-I Quantikine ELISA) was from R&D Systems, the type II and type I collagen ELISAs (ArthroGEnCIA Capture ELISA Kit) from Chondrex (Redmond, WA, USA), and the type X collagen ELISA from Antibodies-online GmbH (Aachen, Germany). The Cell Proliferation reagent WST-1 was from Roche Applied Science (Mannheim, Germany) and the alkaline phosphatase (ALP) staining kit was from Sigma.

### Cell culture

Bone marrow aspirates (~15 ml) were obtained from the distal femurs of patients undergoing total knee arthroplasty ( $n = 26$ ). The study was approved by the Ethics Committee of the Saarland Physicians Council. All patients provided informed consent before inclusion in the study and all procedures were in accordance with the Helsinki Declaration. The hMSCs were isolated and expanded in culture using standard protocols [24,32]. Briefly, aspirates were washed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), centrifuged, and the pellet

was resuspended in Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma) in DMEM (1:1). The resulting fraction was washed, pelleted, and resuspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum with penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µl/ml) (growth medium). Cells were plated in T75 flasks and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide. The medium was exchanged after 24 hours and every 2 to 3 days thereafter using growth medium with recombinant FGF-2 (1 ng/ml). The cells were detached and replated for further experiments at appropriate densities. The hMSCs were analyzed with flow cytometry for expression of stem-cell surface markers (CD71<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>). All experiments were performed with cells at no more than passage two.

#### Plasmids and recombinant adeno-associated virus vectors

The constructs were all derived from the same parental adeno-associated vector-2 genomic clone, pSSV9 [37,38]. rAAV-*lacZ* carries the *lacZ* gene encoding *Escherichia coli* β-galactosidase and rAAV-hIGF-I carries a 536 base pair hIGF-I cDNA fragment [36], both under the control of the cytomegalovirus immediate-early promoter [24,32,36]. rAAV vectors were packaged as conventional (not self-complementary) vectors in the 293 adenovirus-transformed embryonic kidney cell line, using Adenovirus 5 to provide helper functions in combination with the pAd8 helper plasmid as described previously [24,32,36]. Purification, dialysis, and titration of the vectors by real-time polymerase chain reaction (PCR) were performed as described previously [24,32,36], averaging 10<sup>10</sup> transgene copies/ml (ratio virus particles to functional vectors = 500/1).

#### Recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer

Monolayer cultures of undifferentiated hMSCs (2 × 10<sup>4</sup> cells) were transduced with rAAV (20 µl vector; that is, 4 × 10<sup>5</sup> functional recombinant viral particles or multiplicity of infection (MOI) = 20) and kept in growth medium for up to 21 days [24,32]. The hMSC aggregate cultures (2 × 10<sup>5</sup> cells) were prepared and kept in defined chondrogenic medium (high-glucose DMEM 4.5 g/l, penicillin/streptomycin, 6.25 µg/ml insulin, 6.25 µg/ml transferrin, 6.25 µg/ml selenous acid, 5.35 µg/ml linoleic acid, 1.25 µg/ml bovine serum albumin, 1 mM sodium pyruvate, 37.5 µg/ml ascorbate 2-phosphate, 10<sup>-7</sup> M dexamethasone, 10 ng/ml TGFβ3) for transduction (or not) with rAAV (40 µl vector; that is, 8 × 10<sup>5</sup> functional recombinant viral particles or MOI = 4) over a period of 21 days [24,32]. For osteogenic and adipogenic differentiation, hMSCs in monolayer cultures (10<sup>5</sup> cells) were transduced with rAAV (40 µl vector; that is, 8 × 10<sup>5</sup> functional recombinant viral particles or MOI = 8) and induced toward osteogenic differentiation using the StemPro

Osteogenesis Differentiation kit or toward adipogenic differentiation using the StemPro Adipogenesis Differentiation kit (both from Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) [32].

#### Transgene expression

To assess IGF-I secretion, samples were washed twice and placed for 24 hours in serum-free medium. Supernatants were collected at the denoted time points and centrifuged to remove debris, and IGF-I production was measured by ELISA [36]. Quantitative measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany). Transgene expression was also monitored by immunocytochemical and immunohistochemical analyses using a specific primary antibody [24,32,36].

#### Biochemical assays

Cultures were harvested and aggregates were digested with papain [24,32]. Cell proliferation was assessed with the Cell Proliferation reagent WST-1, with optical density proportional to the cell numbers [24,32,36], and by immunolabeling following BrdU incorporation (3 µg/ml for 24 hours) [36]. The DNA and proteoglycan contents were determined with a fluorimetric assay using Hoechst 22358 and by binding to dimethylmethylene blue dye, respectively [24,32,36]. Analysis of the type II, type I, and type X collagen contents was performed by respective ELISAs [24,32,36]. Data were normalized to total cellular proteins using a protein assay (Pierce Thermo Scientific, Fisher Scientific, Schwerte, Germany). All measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan).

#### Histological, immunocytochemical, and immunohistochemical analyses

Monolayer and aggregate cultures were harvested and fixed in 4% formalin. Aggregates were further dehydrated in graded alcohols, embedded in paraffin, and sectioned (3 µm). Sections were stained with hematoxylin and eosin (cellularity), toluidine blue (matrix proteoglycans), and alizarin red (matrix mineralization) as described previously [24,32]. Expression of SOX9, type II, type I, and type X collagen was detected by immunohistochemistry using specific primary antibodies, biotinylated secondary antibodies, and the ABC method with diaminobenzidine as the chromogen [24,32]. Samples were also tested for transgene (IGF-I) expression and BrdU incorporation using specific primary antibodies. To control for secondary immunoglobulins, sections were processed with omission of the primary antibody. Osteogenically induced cultures were stained for ALP activity and adipogenically differentiated cultures were stained with Oil Red O to detect intracellular lipid droplets [32]. Samples were examined



under light microscopy (Olympus BX 45; Olympus, Hamburg, Germany).

### Histomorphometry

The transduction efficiencies, the percentage of cells positive for BrdU uptake and for SOX9 expression, the cell densities on hematoxylin and eosin-stained sections, the aggregate diameters, the intensities of toluidine blue and alizarin red staining and those of type II, type I, and type X collagen immunostaining (all in pixels per standardized area) were measured at three random standardized sites or using 10 serial histologic and immunohistochemical sections for each parameter, test, and replicate condition using the SIS analySIS program (Olympus), Adobe Photoshop (Adobe Systems, Unterschleissheim, Germany), and Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) [24,32]. The percentages of areas stained for ALP or Oil Red O were calculated as being the ratios of positively stained surface to the total surface evaluated [32]. The ALP and Oil red O staining intensities were measured in pixels per standardized area [32].

### Real-time reverse transcription polymerase chain reaction analyses

Total cellular RNA was extracted from the cultures using the RNeasy Protect Mini Kit with an on-column RNase-free DNase treatment (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted in 30 µl RNase-free water. Reverse transcription was carried out with 8 µl eluate using the 1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche Applied Science). An aliquot of the cDNA product (2 µl) was amplified with real-time PCR using the Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on an Mx3000P QPCR operator system (Stratagene) as follows: initial incubation (95°C, 10 minutes), amplification for 55 cycles (denaturation at 95°C, 30 seconds; annealing at 55°C, 1 minute; extension at 72°C, 30 seconds), denaturation (95°C, 1 minute), and final incubation (55°C, 30 seconds). The primers (Invitrogen, Darmstadt, Germany) used were SOX9 (chondrogenic marker) (forward, 5'-ACACACAGCTCACTCGACCTTG-3'; reverse, 5'-GGGAATTCTGGTTGGTCCTCT-3'), type II collagen (COL2A1; chondrogenic marker) (forward, 5'-GGACTTTTCTCCCCTCTCT-3'; reverse, 5'-GACCCGAAGGTCTTACAGGA-3'), type I collagen (COL1A1; osteogenic marker) (forward, 5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3'; reverse, 5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'), type X collagen (COL10A1; marker of hypertrophy) (forward, 5'-CCCTCTTGTTAGTGCCAACC-3'; reverse, 5'-AGATTCCAGTCCTTGGGTCA-3'), matrix metalloproteinase 13 (MMP13; marker of terminal differentiation) (forward, 5'-AATTTTCACTTTTGGCAATGA-3'; reverse, 5'-CAAATAATTTATGAAAAAGGGATGC-3'), runt-related transcription factor 2 (RUNX2; osteogenic marker) (forward,

5'-GCAGTTCCCAAGCATTTCAT-3'; reverse, 5'-CACTCTGGCTTTGGGAAGAG-3'), ALP (osteogenic marker) (forward, 5'-TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA-3'; reverse, 5'-ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC-3'), β-catenin (mediator of the Wnt signaling pathway for osteoblast lineage differentiation) (forward, 5'-CAAGTGGGTGGTATAGAGG-3'; reverse, 5'-GCGGGACAAAGGCAAGA-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping gene and internal control) (forward, 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; reverse, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3') (all 150 nM final concentration) [24,32]. Control conditions included reactions using water and nonreverse-transcribed mRNA. Specificity of the products was confirmed by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis. The threshold cycle (Ct) value for each gene of interest was measured for each amplified sample using MxPro QPCR software (Stratagene), and values were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, as described previously [24,32].

### Statistical analyses

Each treatment condition was performed in triplicate in three independent experiments for each patient. Data are expressed as the mean ± standard deviation of separate experiments. The *t* test and the Mann–Whitney rank-sum test were used where appropriate. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

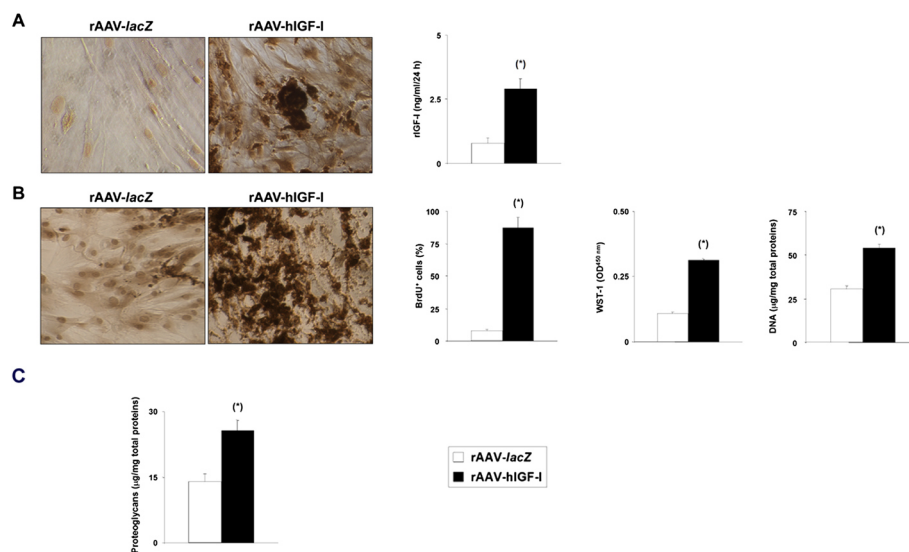
## Results

### Sustained expression of IGF-I in undifferentiated hMSCs via rAAV gene transfer

hMSCs were first transduced with the candidate rAAV-hIGF-I vector in undifferentiated monolayer cultures compared with a control condition (application of a reporter rAAV-*lacZ* gene vector) [24,32] to examine the ability of rAAV to mediate overexpression of the growth factor over time in these cells *in vitro* at an undifferentiated stage. Sustained, intense immunoreactivity to IGF-I was detected in cells transduced with rAAV-hIGF-I compared with the control treatment after 5 days (data not shown) and for up to 21 days, with transduction efficiencies of 76 to 84% (Figure 1A). This finding was corroborated by an analysis of the IGF-I production levels in IGF-I-transduced cells ( $1.2 \pm 0.2$  vs.  $0.3 \pm 0.1$  ng/ml/24 hours in *lacZ*-treated cells on day 14, and  $2.9 \pm 0.4$  vs.  $0.8 \pm 0.2$  ng/ml/24 hours on day 21; an up to fourfold difference, always *P* ≤ 0.001) (Figure 1A).

### Effects of rAAV-hIGF-I transduction on the biological activities of undifferentiated hMSCs

The candidate rAAV-hIGF-I vector was next applied to undifferentiated monolayer cultures of hMSCs to investigate the effects of IGF-I treatment on the biological activities of the cells (proliferation, matrix synthesis) compared with



**Figure 1 Recombinant adeno-associated virus-mediated IGF-I gene transfer in undifferentiated monolayer cultures of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** Cells were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ (20  $\mu$ l each vector) as described in Methods and histologically processed after 21 days to monitor (A) transgene (insulin-like growth factor I) expression by immunocytochemical analysis and enzyme-linked immunosorbent assay, (B) levels of cell proliferation by immunocytochemical detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and histomorphometry, by WST-1 assay, and by detection of the DNA contents, and (C) levels of proteoglycan synthesis (magnification  $\times 4$ ). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. hIGF-I, human insulin-like growth factor I; OD, optical density; rAAV, recombinant adeno-associated virus.

control *lacZ* treatment. Immunodetection of BrdU incorporation in transduced cells revealed significantly increased levels of proliferation mediated by rAAV-hIGF-I compared with rAAV-lacZ (82 to 93% vs.  $\leq 9\%$  BrdU<sup>+</sup> cells on day 21; up to 10.3-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 1B). These results were corroborated by the results of a WST-1 assay ( $\sim 0.313$  and  $0.110$  optical density at  $450$  nm in IGF-I-treated vs. *lacZ*-treated cells on day 21; 2.8-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 1B) and when monitoring the DNA contents in the cultures ( $53.9 \pm 2.3$  and  $30.6 \pm 1.8$   $\mu$ g/mg total proteins in IGF-I-treated vs. *lacZ*-treated cells on day 21; 1.8-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 1B). Further analyses also revealed that application of rAAV-hIGF-I significantly increased the proteoglycan contents in the cultures at the end of the evaluation period compared with *lacZ* treatment ( $25.7 \pm 2.3$  vs.  $14.1 \pm 1.7$   $\mu$ g/mg total proteins on day 21; 1.8-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 1C).

#### Prolonged rAAV-mediated IGF-I expression in chondrogenically differentiated hMSCs

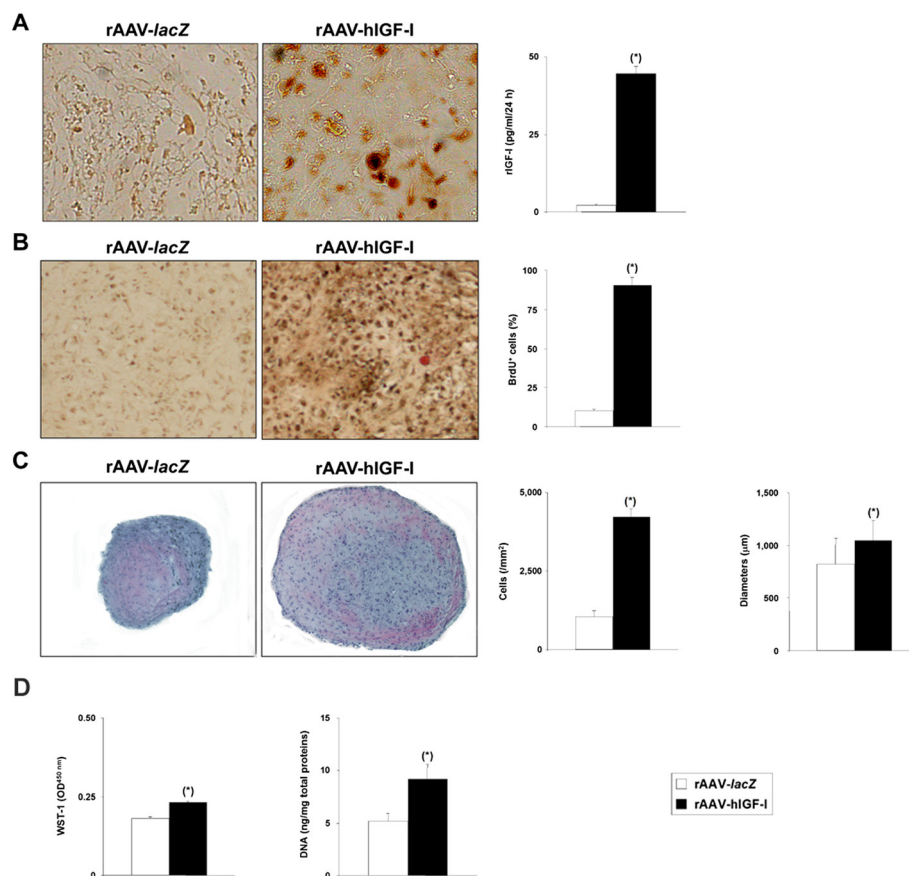
hMSCs were then transduced with rAAV-hIGF-I in chondrogenically induced aggregate cultures [10,12,13], again using rAAV-lacZ as a control condition because rAAV does not impair the potency of these cells [20,24,32,39], in order to evaluate the ability of the candidate vector to promote the expression of IGF-I over time in cells committed toward the chondrocyte phenotype, with a focus on day 21 where chondrogenesis is known to occur [10,12,13].

In agreement with the findings in monolayer cultures, a strong, durable signal specific for the growth factor was detected by immunohistochemistry in cells transduced with rAAV-hIGF-I compared with *lacZ* for up to 21 days, with transduction efficiencies of 74 to 81% (Figure 2A). This result was also substantiated by an analysis of the IGF-I production levels in IGF-I-transduced cells ( $44.5 \pm 2.3$  vs.  $2.1 \pm 0.4$  pg/ml/24 hours in *lacZ*-treated aggregates or  $1.9 \pm 0.2$  pg/ml/24 hours in untreated aggregates on day 21; 21.2-fold to 23.4-fold difference,  $P \leq 0.001$ , while there was no difference between controls,  $P = 0.130$ ) (Figure 2A).

#### Effects of rAAV-hIGF-I treatment on the biological activities and differentiation potential of chondrogenically induced hMSCs

Cells were next transduced with rAAV-hIGF-I and induced in aggregate cultures toward chondrogenesis in order to examine the effects of IGF-I treatment upon the biological activities and chondrogenic differentiation potential of the cells versus the *lacZ* control condition. As we and others clearly reported previously that rAAV gene transfer does not impair the potency of hMSCs [20,24,32,39], we did not further include a condition without vector treatment. Immunodetection of BrdU incorporation in IGF-I-transduced cells revealed significantly increased levels of proliferation compared with *lacZ* (87 to 94% vs.  $\leq 11\%$  BrdU<sup>+</sup> cells on day 21; up



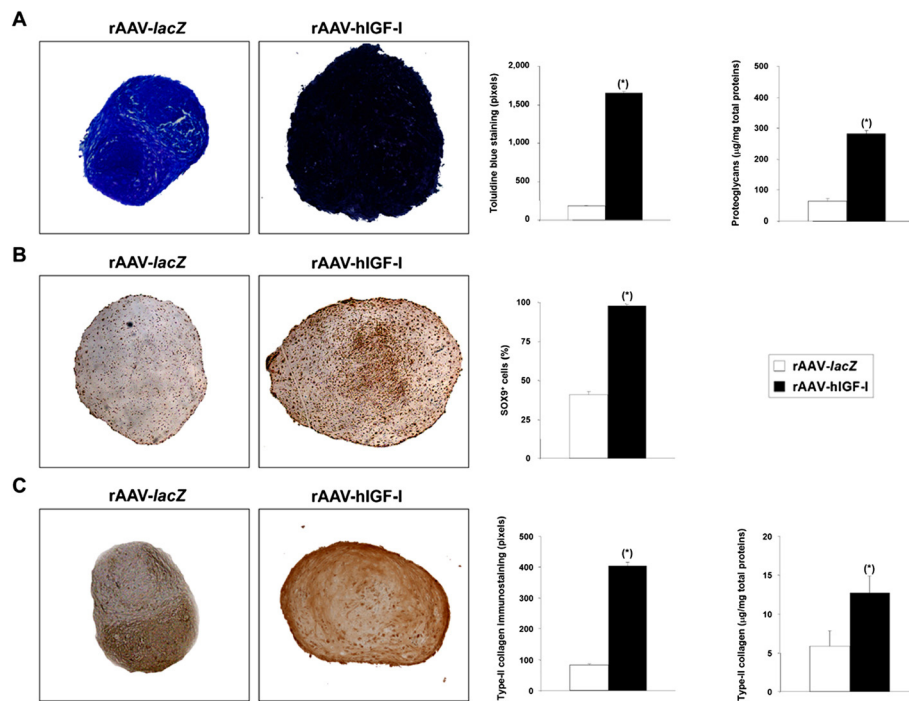


**Figure 2 Recombinant adeno-associated virus-mediated IGF-I gene transfer in chondrogenically induced cultures of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell aggregates were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ (40  $\mu$ l each vector) as described in Methods and were histologically processed after 21 days to monitor (A) transgene (insulin-like growth factor I) expression by immunohistochemical analysis (magnification  $\times 20$ ) and enzyme-linked immunosorbent assay, and the levels of cell proliferation by immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and histomorphometry (B) (magnification  $\times 10$ ), by hematoxylin and eosin staining and histomorphometry (C) (magnification  $\times 4$ ), or by biochemical assays (WST-1 assay and detection of the DNA contents) (D). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. hIGF-I, human insulin-like growth factor I; OD, optical density; rAAV, recombinant adeno-associated virus.

to 8.5-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 2B). These results were confirmed by an analysis of the cell densities on hematoxylin and eosin-stained sections from aggregates ( $4,220 \pm 254$  vs.  $1,050 \pm 187$  cells/mm<sup>2</sup> on day 21; fourfold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 2C), by the results of a WST-1 assay ( $\sim 0.231$  and  $0.182$  optical density at 450 nm in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; 1.3-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 2D), or when monitoring the DNA contents in the cultures ( $9.2 \pm 1.4$  and  $5.2 \pm 0.7$  ng/mg total proteins in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; 1.8-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 2D). Also of note, application of the IGF-I vector significantly increased the diameters of the aggregates at the end of the period of evaluation compared with lacZ transduction ( $1,044 \pm 190$  vs.  $822 \pm 244$   $\mu$ m; 1.3-fold difference,  $P = 0.021$ ) (Figure 2C).

When samples were processed to monitor the metabolic and differentiation activities of hMSCs, successful

chondrogenesis was noted on histological sections of aggregates as evidenced by toluidine blue staining and type II collagen deposition, revealing more intense staining when the IGF-I vector was applied ( $1,657 \pm 22$  vs.  $181 \pm 8$  and  $405 \pm 12$  vs.  $83 \pm 4$  pixels of toluidine blue staining and type II collagen immunostaining, respectively, in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; up to 9.2-fold difference, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 3A,C). These results were substantiated by an evaluation of the proteoglycan and type II collagen contents in the aggregates ( $283.5 \pm 10.5$  and  $64.5 \pm 7.8$   $\mu$ g proteoglycans/mg total proteins and  $12.7 \pm 2.2$  and  $5.9 \pm 1.9$   $\mu$ g type II collagen/mg total proteins in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; up to 4.4-fold difference, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 3A,C), possibly due to an increase in SOX9 expression promoted by IGF-I gene transfer ( $98 \pm 1\%$  vs.  $41 \pm 2\%$  of SOX9<sup>+</sup> cells, respectively, in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; 2.4-fold



**Figure 3 Metabolic and differentiation activities in chondrogenically induced cultures of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with rAAV-hIGF-I.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell aggregates were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ as described in Figure 2 and histologically processed after 21 days to evaluate the production of matrix proteoglycans (toluidine blue staining with histomorphometry and detection of the proteoglycan contents) (A) and the expression of SOX9 with histomorphometry (B) and type II collagen (specific immunodetection with histomorphometry and detection of the type II collagen contents) (C) (all at magnification  $\times 4$ ). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. hIGF-I, human insulin-like growth factor I; rAAV, recombinant adeno-associated virus.

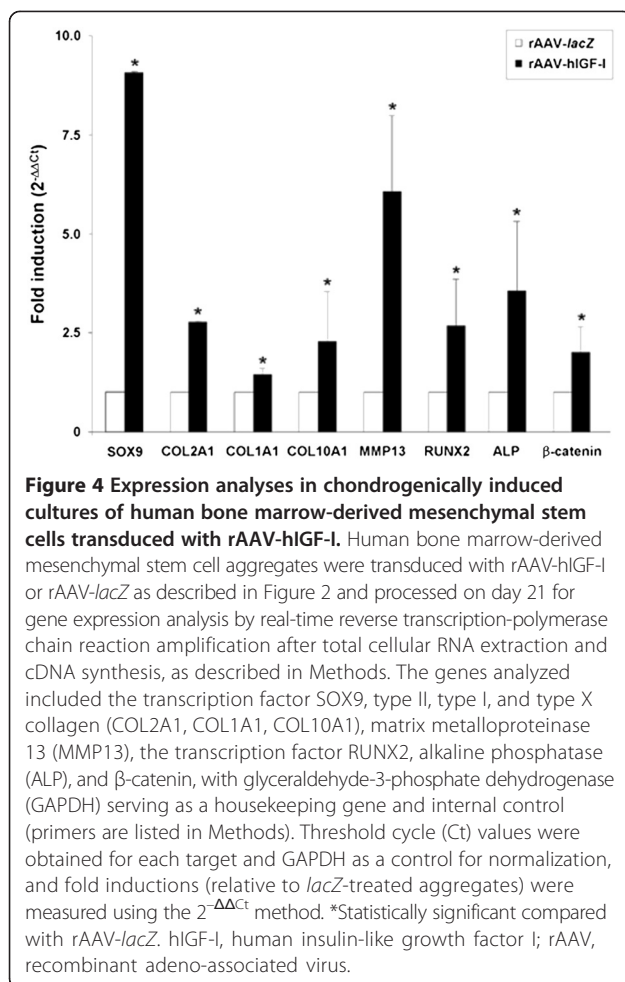
difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 3B). An analysis of the gene expression profiles by real-time reverse transcription (RT)-PCR further confirmed these findings (9.1-fold and 2.8-fold higher SOX9 and COL2A1 expression levels, respectively, in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 4).

Interestingly, administration of the IGF-I vector compared with lacZ led to increases in the intensity of type I and type X collagen immunostaining and of alizarin red staining ( $60 \pm 2$  vs.  $43 \pm 2$ ,  $62 \pm 3$  vs.  $49 \pm 2$ , and  $56 \pm 2$  vs.  $42 \pm 2$  pixels of type I and type X collagen immunostaining and alizarin red staining, respectively, in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates on day 21; up to 1.4-fold difference, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 5A,B,C). These findings were corroborated by an evaluation of the type I and type X collagen contents in the aggregates ( $36.3 \pm 2.9$  and  $22.8 \pm 2.7$   $\mu\text{g}$  type I collagen/mg total proteins and  $1.2 \pm 0.1$  and  $0.8 \pm 0.1$  ng type X collagen/mg total proteins in IGF-I-treated vs. lacZ-treated cells on day 21; up to 1.6-fold difference, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 5A,B) and by real-time RT-PCR analysis (1.4-fold and 2.2-fold higher COL1A1 and COL10A1 expression levels, respectively, in IGF-I-treated vs. lacZ-treated aggregates; always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 4). Of further note,

such an analysis also revealed enhanced expression profiles for MMP13, RUNX2, ALP, and  $\beta$ -catenin upon IGF-I gene transfer compared with lacZ (6.1-fold, 2.5-fold, 3.6-fold, 1.9-fold, and 1.9-fold, respectively; always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 4).

#### Effects of rAAV-hIGF-I treatment on the osteogenic and adipogenic differentiation potential of hMSCs

The candidate IGF-I vector was next provided to osteogenically and adipogenically differentiated hMSCs over time to estimate further the effects of the growth factor via rAAV application on the potential for osteogenic and adipogenic differentiation of the cells compared with control lacZ treatment. Successful osteogenic differentiation was noted in the induced cultures as evidenced by ALP staining (Figure 6A). Notably, application of rAAV-hIGF-I significantly increased the percentage of stained areas as well as the intensities of staining after 21 days compared with lacZ condition ( $62 \pm 1\%$  vs.  $22 \pm 2\%$  and  $1.773 \pm 0.017$  vs.  $1.678 \pm 0.009 \times 10^6$  pixels/mm<sup>2</sup>, respectively; up to 1.1-fold difference, always  $P \leq 0.001$ ) (Figure 6A). Successful adipogenic differentiation was also achieved in the induced cultures as seen by the accumulation of lipid droplets after staining with Oil Red O (Figure 6B).



Interestingly, while there was no significant difference between the percentages of stained areas on day 21 between IGF-I-treated and lacZ-treated samples ( $75 \pm 1\%$  and  $74 \pm 1\%$ ,  $P = 0.215$ ), the intensities of staining were significantly higher when the rAAV-hIGF-I was applied ( $1.110 \pm 0.001$  vs.  $1.009 \pm 0.002 \times 10^6$  pixels/mm<sup>2</sup>; 1.1-fold difference,  $P \leq 0.001$ ) (Figure 6B).

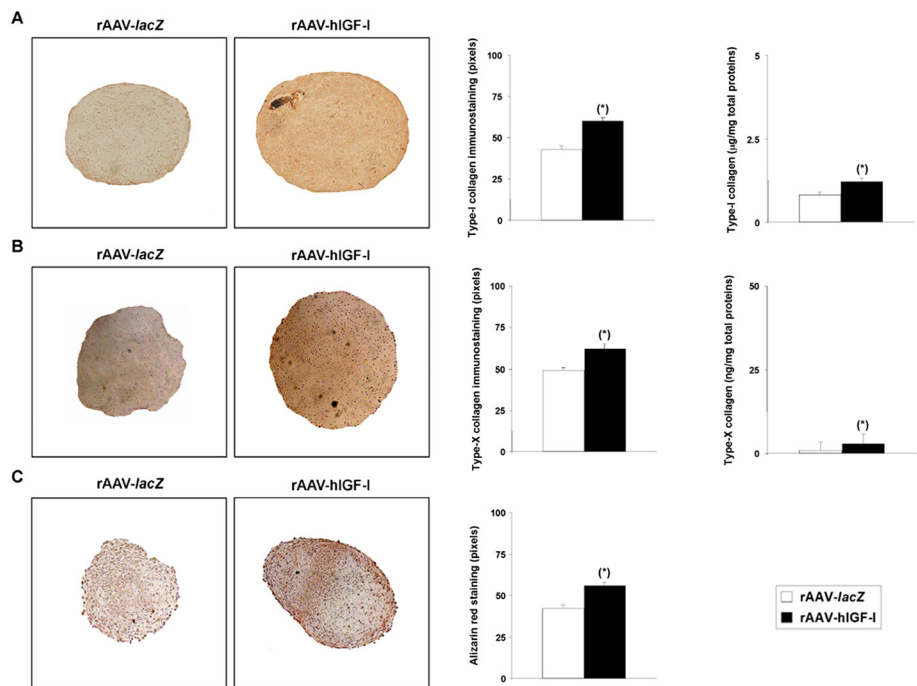
## Discussion

The concept of transplanting progenitor cells such as MSCs in articular cartilage defects is a promising approach to enhance the intrinsic healing capacities of this particular tissue [40-42] and is already a clinical reality employed to treat patients [11]. Yet the production of an original, hyaline cartilage tissue has never been reported in any of the lesions so far treated with stem cells, leading instead to the formation of a fibrocartilage with poor biomechanical properties, showing the need for improved procedures. In this regard, the genetic manipulation of MSCs is an attractive approach to address such an issue by improving their potentiality for enhanced

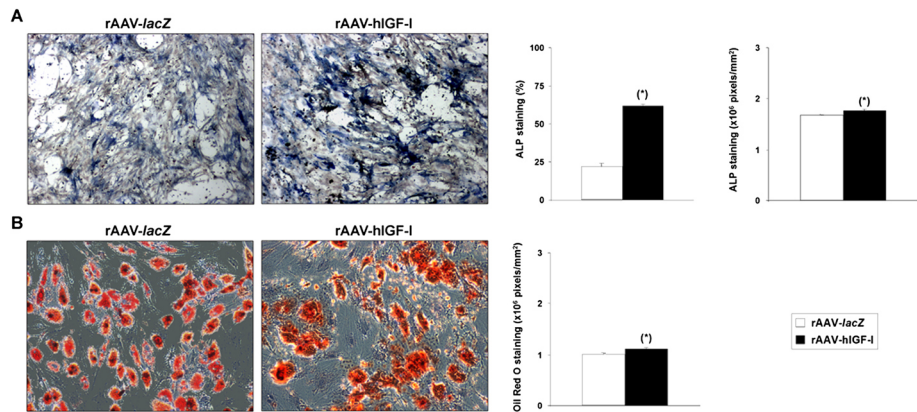
cartilage repair processes upon transplantation in the defects. Here, we focused on delivering a candidate sequence coding for the anabolic and mitogenic IGF-I factor by transduction with rAAV, one of the safest and most effective gene vehicles available to date for human gene therapy, in light of our previous work showing that such a construct allows for stable reconstruction of human osteoarthritic cartilage *in situ* [36].

Our data first demonstrate that highly effective and prolonged expression of IGF-I can be achieved upon rAAV transduction in hMSCs using undifferentiated and chondrogenically induced cultures for at least 21 days (the longest time point evaluated), with transduction efficiencies reaching up to 84%, all in good agreement with previous findings using the same vector to target articular chondrocytes [36] or when applying other rAAV to this cell type [20,24,32,39], probably due to the good persistence of rAAV transgenes in their targets [43]. The levels achieved here in hMSC aggregates with rAAV were 44.5 pg IGF-I/ml/24 hours after 21 days of culture, while higher but only very short-term production has been reported upon transduction with IGF-I adenoviral vectors (from 75 to 30 ng/ml in hMSCs between days 3 and 7, and of 50 to 80 ng/ml for only 3 days in animal cells, with undetectable expression levels beyond these time points) [19,44,45]. This is probably due to the much higher MOIs applied in these previous studies (MOI = 100 to 250) whereas we used much lower rAAV MOIs (MOI = 4, 25-fold to 63-fold less vector) in a similar three-dimensional environment, all in good agreement with the properties of each class of vector [46,47].

The data further indicate that IGF-I overexpression using rAAV in the conditions applied here was capable of stimulating both the proliferative and anabolic activities of hMSCs in undifferentiated monolayer cultures over a prolonged period of time (21 days), probably due to the sustained levels of IGF-I expression achieved with this stable class of gene transfer vector, all in good agreement with the properties of the growth factor [36,48,49]. Most remarkably, treatment with the current rAAV IGF-I construct also allowed one to enhance the differentiation of these cells in chondrogenically induced aggregate cultures compared with the control (lacZ) treatment, as noted by the increased expression levels and deposition of proteoglycans and type II collagen. These results are in marked contrast with previous findings from different groups who reported that application of IGF-I to MSCs via gene transfer was not capable of inducing such processes in similar culture conditions [19,44,45]. It is important to mention that all these earlier studies focused on the use of much less efficient adenoviral vectors that allowed only for very short-term transgene expression (not beyond a week), while we evidenced a prolonged production of IGF-I with rAAV over the whole period of evaluation (21 days).



**Figure 5 Hypertrophic differentiation in chondrogenically induced cultures of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with rAAV-hIGF-I.** Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell aggregates were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ as described in Figure 2 and histologically processed after 21 days to examine the expression of type I collagen **(A)** and type X collagen **(B)** by immunohistochemistry/histomorphometry and by analysis of the type I collagen **(A)** and type X collagen **(B)** contents, and to evaluate matrix mineralization (alizarin red staining with histomorphometry) **(C)** (all at magnification  $\times 4$ ). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. hIGF-I, human insulin-like growth factor I; rAAV, recombinant adeno-associated virus.



**Figure 6 Analyses in osteogenically and adipogenically differentiated cultures of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells transduced with rAAV-hIGF-I.** Cells in monolayer cultures were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ (40  $\mu$ l each vector) and induced toward osteogenic or adipogenic differentiation as described in Methods. Cultures were processed on day 21 for **(A)** alkaline phosphatase (ALP) staining with histomorphometry (osteogenesis; magnification  $\times 4$ ) and **(B)** Oil Red O staining with histomorphometry (adipogenesis; magnification  $\times 10$ ). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. hIGF-I, human insulin-like growth factor I; rAAV, recombinant adeno-associated virus.



Moreover, our data are strongly supported by work from Uebersax and colleagues [50], who showed that the slow, sustained release of IGF-I from biocompatible scaffolds can promote the chondrogenic differentiation of hMSCs over a similar, extended period of time. Of further note, we observed that rAAV IGF-I gene transfer was capable of stimulating the expression levels of SOX9, a key chondrogenic factor for MSC differentiation, as noted when providing the same vector to human chondrocytes [36] and in good agreement with previous findings [51], probably resulting in the enhanced commitment of the cells toward chondrogenesis compared with control treatment. Interestingly, we noted that administration of rAAV IGF-I led to the expression of hypertrophic and osteogenic markers in hMSCs. This was probably a result of the enhanced expression levels for MMP13 (marker of terminal differentiation), RUNX2 (transcription factor controlling the osteoblastic expression of COL1, COL10, and MMP13), ALP (osteogenic marker), and  $\beta$ -catenin (mediator of the Wnt pathway for osteogenic differentiation) in response to IGF-I treatment, concordant with the osteogenic activities of the growth factor further evidenced here and with previous findings [52]. Also of note, IGF-I gene transfer with rAAV enhanced the adipogenic differentiation of the cells, again in good agreement with previous findings [53].

Overall, these results suggest that a tight control of IGF-I production is a prerequisite for the optimal use of the current rAAV vector in ongoing, clinically relevant stem cell-based experimental models of cartilage defects *in vivo* [54,55]. A balance of expression that allows one to produce sufficient levels of IGF-I for chondrogenic differentiation without activation of premature hypertrophic maturation and ossification may be reached by applying various (lower) vector doses, using lineage-specific/tissue-specific or regulatable promoters, and/or by providing additional factors that have the ability to prevent such undesirable effects. Among them, FGF-2, the SOX transcription factors, and molecules that may silence osteogenic pathways such as an anti-Runx2/Cbfa1 small interfering RNA are potent candidates to achieve this goal as they have been already reported for their ability to delay hypertrophic processes in MSCs [24,29,30,32,34]. In this regard, rAAV vectors are strong tools that can promote a simultaneous expression of separate genes in target cells without interference [56]. In conclusion, the present findings show the potential of using rAAV-mediated gene transfer as a tool for future stem cell-based approaches to treat articular cartilage defects.

## Conclusions

In summary, our study suggests that the genetic modification of hMSCs via rAAV for the durable expression

of IGF-I is a strong tool to induce the chondrogenic commitment of the cells but that a tight regulation of the production levels will be necessary to adapt the strategy in experimental settings of articular cartilage repair to control the premature terminal differentiation of the cells *in vivo*.

## Abbreviations

ALP: alkaline phosphatase; BrdU: bromodeoxyuridine; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FGF-2: basic fibroblast growth factor; hIGF-I: human insulin-like growth factor I; hMSC: human bone marrow-derived mesenchymal stem cell; IGF-I: insulin-like growth factor I; MMP13: matrix metalloproteinase 13; MOI: multiplicity of infection; MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell; PCR: polymerase chain reaction; rAAV: recombinant adeno-associated virus; RT: reverse transcription; RUNX2: runt-related transcription factor 2; TGF $\beta$ : transforming growth factor beta.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

JF carried out the experiments on cell culture and commitment, gene transfer, transgene expression and histological/immunohistochemical/biochemical/real-time RT-PCR analyses, interpreted the data, and helped to draft the manuscript. JKV, AR-R, and GS participated in experiments involving cell culture, rAAV production, histological processing, and real-time RT-PCR. HM was involved in analysis of the data. MC designed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgments

This research was funded by grants from the German Osteoarthritis Foundation (Deutsche Arthrose-Hilfe e.V.) and the AO Foundation (Davos, Switzerland). The authors thank RJ Samulski (The Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA), X Xiao (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA), and EF Terwilliger (Division of Experimental Medicine, Harvard Institutes of Medicine and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, USA) for providing genomic adeno-associated vector-2 plasmid clones and the 293 cell line, and AJ D'Ercole and B Moats-Staats (Department of Pediatrics, University of North Carolina, Chapel Hill) for the human IGF-I cDNA.

## Author details

<sup>1</sup>Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University Medical Center, Kirrbergerstr. Bldg 37, D-66421 Homburg/Saar, Germany. <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Saarland University Medical Center, Kirrbergerstr. Bldg 37, D-66421 Homburg/Saar, Germany.

Received: 31 May 2014 Revised: 15 July 2014

Accepted: 18 August 2014 Published: 27 August 2014

## References

1. Buckwalter JA: Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998, **28**:192–202.
2. O'Driscoll SW: The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998, **80**:1795–1812.
3. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldber A, Williams AM, Skinner JA, Pringle J: A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 2003, **85**:223–230.
4. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994, **331**:889–895.
5. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R: Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 2003, **85-A**:185–192.
6. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Gronqvist T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksson V, Johansen O: Autologous chondrocyte

- implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004, **86**-A455-464.
7. Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**:432-463.
8. Tibesku CO, Suzwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, Van Aken H, Fuchs S: Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res* 2004, **22**:1210-1214.
9. Johnstone B, Yoo JU: Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 1999, **367**:S156-S162.
10. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry F, Chichester CO, Pittenger MF: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998, **4**:415-428.
11. Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, Madry H, Cucchiariini M: Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 2014, **7**:1-17.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, **284**:143-147.
13. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 1998, **80**:1745-1757.
14. Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Bakker K, Both S, Platenburg PP, Oner FC, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA: Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 2002, **8**:911-920.
15. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F: Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002, **46**:704-713.
16. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA: Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 2001, **19**:117-125.
17. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M: Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003, **33**:919-926.
18. Haleem-Smith H, Calderon R, Song Y, Tuan RS, Chen FH: Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2012, **113**:1245-1252.
19. Kawamura K, Chu CR, Sobajima S, Robbins PD, Fu FH, Izzo NJ, Niyibizi C: Adenoviral-mediated transfer of TGF- $\beta$ 1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol* 2005, **33**:865-872.
20. Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR: Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- $\beta$ 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* 2007, **14**:804-813.
21. Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, Gilbert F, Ghivizzani SC, Göbel S, Jakob F, Nöth U, Rudert M: Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R168-R180.
22. Neumann AJ, Alini M, Archer CW, Stoddart MJ: Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A* 2013, **19**:1285-1294.
23. Steinert AF, Proffen B, Kunz M, Hemdrich C, Ghivizzani SC, Nöth U, Rethwilm A, Eulert J, Evans CH: Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:R148-R162.
24. Cucchiariini M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H: Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 2011, **17**:1921-1933.
25. Böcker W, Yin Z, Drosse I, Haasters F, Rossmann O, Wierer M, Popov C, Locher M, Mutschler W, Docheva D, Schieker M: Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* 2008, **12**:1347-1359.
26. Huang G, Zheng Q, Sun J, Guo C, Yang J, Chen R, Xu Y, Wang G, Shen D, Pan Z, Jin J, Wang J: Stabilization of cellular properties and differentiation multipotential of human mesenchymal stem cells transduced with hTERT gene in a long-term culture. *J Cell Biochem* 2008, **103**:1256-1269.
27. Liu TM, Ng WM, Tan HS, Vinitha D, Yang Z, Fan JB, Zou Y, Hui JH, Lee EH, Lim B: Molecular basis of immortalization of human mesenchymal stem cells by combination of p53 knockdown and human telomerase reverse transcriptase overexpression. *Stem Cells Dev* 2011, **22**:268-278.
28. Babister JC, Tare RS, Green DW, Inglis S, Mann S, Oreffo RO: Genetic manipulation of human mesenchymal progenitors to promote chondrogenesis using 'bead-in-bead' polysaccharide capsules. *Biomaterials* 2008, **29**:58-65.
29. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou A, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI: The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 2004, **50**:3561-3573.
30. Kim HJ, Im GI: Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2011, **20**:2103-2114.
31. Kim JH, Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Do HJ, Lim HY, Kim JM, Park KH: The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials* 2011, **32**:268-278.
32. Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, Schmitt G, Kohn D, Cucchiariini M: SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2012, **3**:22-36.
33. Yang HN, Park JS, Woo DG, Jeon SY, Do HJ, Lim HY, Kim SW, Kim JH, Park KH: Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX trio genes. *Biomaterials* 2011, **32**:7695-7704.
34. Jeon SY, Park JS, Yang HN, Woo DG, Park KH: Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* 2012, **33**:4413-4423.
35. Liu TM, Guo XM, Tan HS, Hui JH, Lim B, Lee EH: Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* 2011, **63**:2711-2720.
36. Weiner A, Madry H, Venkatesan JK, Schmitt G, Frisch J, Wezel A, Jung J, Kohn D, Terwilliger EF, Trippel SB, Cucchiariini M: Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulin-like growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med* 2012, **18**:346-358.
37. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T: A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 1987, **61**:3096-3101.
38. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T: Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989, **63**:3822-3828.
39. Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Soballe K, Barry F: Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 2007, **13**:93-99.
40. Bulman SE, Barron V, Coleman CM, Barry F: Enhancing the mesenchymal stem cell therapeutic response: cell localization and support for cartilage repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2013, **19**:58-68.
41. Johnstone B, Alini M, Cucchiariini M, Dodge GR, Eglis D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ: Tissue engineering for articular cartilage repair - the state of the art. *Eur Cell Mater* 2013, **25**:248-267.
42. Tuan RS: Regenerative medicine in 2012: the coming of age of musculoskeletal tissue engineering. *Nat Rev Rheumatol* 2013, **9**:74-76.
43. Xiao X, Li J, Samulski RJ: Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996, **70**:8098-8108.
44. Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH, Ghivizzani SC: Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 2005, **12**:219-228.
45. Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Nöth U, Evans CH, Ghivizzani SC: Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A* 2009, **15**:1127-1139.
46. Cucchiariini M, Madry H: Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 2005, **7**:1495-1509.
47. Madry H, Cucchiariini M: Advances and challenges in gene-based approaches for osteoarthritis. *J Gene Med* 2013, **15**:343-355.

48. Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ: **Growth factor stimulation of adult articular cartilage.** *J Orthop Res* 1989, **7**:35–42.
49. Trippel SB: **Growth factor actions on articular cartilage.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**:129–132.
50. Uebersax L, Merkle HP, Meinel L: **Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.** *J Control Release* 2008, **127**:12–21.
51. Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmzadeh M, Mobasheri A: **IGF-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and Erk1/2.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**:1382–1395.
52. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG: **Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells.** *Stem Cells Dev* 2005, **14**:621–631.
53. Scavo LM, Karas M, Murray M, Leroit D: **Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**:3543–3553.
54. Cucchiari M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF: **Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2.** *Mol Ther* 2005, **12**:229–238.
55. Cucchiari M, Orth P, Madry H: **Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo.** *J Mol Med* 2013, **91**:625–636.
56. Cucchiari M, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H: **Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with SOX9 via rAAV gene transfer.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**:2476–2488.

doi:10.1186/scrt491

**Cite this article as:** Frisch *et al.*: Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 2014 **5**:103.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



# Determination of the Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Genetically Modified to Overexpress Transforming Growth Factor- $\beta$ via Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors

Janina Frisch,<sup>1</sup> Jagadeesh Kumar Venkatesan,<sup>1</sup> Ana Rey-Rico,<sup>1</sup> Gertrud Schmitt,<sup>1</sup>  
Henning Madry,<sup>1,2</sup> and Magali Cucchiaroni<sup>1</sup>

## Abstract

Genetic modification of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for use in transplantation settings may be a valuable strategy to enhance the repair processes in articular cartilage defects. Here, we evaluated the potential of overexpressing the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  via recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector-mediated gene transfer to promote the chondrogenic differentiation of human MSCs (hMSCs). A human TGF- $\beta$  sequence was delivered to undifferentiated and chondrogenically induced primary hMSCs, using rAAV vectors to test the efficacy and duration of transgene expression and its effects on the chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation patterns of the cells compared with control (*lacZ*) treatment after 21 days *in vitro*. Significant, durable TGF- $\beta$  expression was noted both in undifferentiated and chondrogenically induced hMSCs transduced with the candidate rAAV-hTGF- $\beta$  vector for up to 21 days compared with rAAV-*lacZ* treatment, allowing for increased proliferative, metabolic, and chondrogenic activities via stimulation of the critical SOX9 (SRY [sex-determining region Y]-related HMG [high-mobility group] box 9) chondrogenic pathway. Overexpression of TGF- $\beta$  under the conditions applied here also activated the hypertrophic and osteogenic differentiation processes in the treated cells. Such effects were noted in association with enhanced levels of  $\beta$ -catenin and Indian hedgehog and decreased parathyroid hormone-related protein expression. The current findings show that rAAV vectors provide advantageous vehicles for gene- and stem cell-based approaches to treat articular cartilage defects, requiring tight regulation of TGF- $\beta$  expression to avoid hypertrophy as candidate treatment for future applications in clinically relevant animal models *in vivo*.

## Introduction

**A**DULT ARTICULAR CARTILAGE is the tissue that allows for the gliding and weight-bearing on articular surfaces. Hyaline articular cartilage is composed of chondrocytes surrounded by an extracellular matrix made of proteoglycans bound to 70–80% water and type II collagen, with other molecules (type IX, XI, VI, and XIV collagen; cartilage oligomeric matrix protein; link protein; decorin; fibromodulin; fibronectin; and tenascin). In the absence of vascularity and lymphatic drainage that otherwise may provide reparative cells to a site of injury, damaged cartilage such as after acute trauma or in degenerative osteoarthritis does not fully regenerate, and the lesions persist and only progress over time (Buckwalter,

1998; O'Driscoll, 1998). Several options are currently employed to treat those injuries, including pharmacological regimens and surgical interventions, yet full reproduction of an original structure and functionality in the cartilage remains challenging (Brittberg *et al.*, 1994; Bentley *et al.*, 2003; Horas *et al.*, 2003; Knutsen *et al.*, 2004). Most of the therapies available to date only generate a fibrocartilaginous repair tissue made of type I instead of type II collagen that does not fully integrate with the surrounding cartilage and has higher susceptibility to mechanical stress (Buckwalter, 1998; Hunziker, 2002; Knutsen *et al.*, 2004; Tibesku *et al.*, 2004).

Approaches based on gene and stem cell therapy have gained increasing attention as they may provide powerful tools to improve the current treatments for articular cartilage

<sup>1</sup>Center of Experimental Orthopedics and <sup>2</sup>Department of Orthopedic Surgery, Saarland University Medical Center, D-66421 Homburg, Germany.



lesions. Progenitor cells such as bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are an advantageous source of repopulating cells as MSCs have a reliable potential for chondrogenic differentiation (Mackay *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 1998; Johnstone and Yoo, 1999; Pittenger *et al.*, 1999) and show regenerative properties to heal cartilage lesions in patients (Orth *et al.*, 2014). Still, the use of MSCs in the clinics is currently hindered by the large amounts of cells needed for implantation and their age-related decline in life span, proliferation, and potency (Muschler *et al.*, 2001; Mendes *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002; Stenderup *et al.*, 2003). Genetic modification of MSCs has the potential to overcome such hurdles and various experimental studies showed that application of diverse candidate gene sequences such as cartilage oligomeric matrix protein, bone morphogenetic proteins, basic fibroblast growth factor (FGF-2), the SOX (SRY [sex-determining region Y]-related HMG [high-mobility group] box) family of transcription factors, zinc finger protein 145 (ZNF145), and Indian hedgehog (Ihh) modulates the chondrogenic differentiation pathways in these cells *in vitro* (Ikeda *et al.*, 2004; Babister *et al.*, 2008; Steinert *et al.*, 2009, 2012; Cucchiari *et al.*, 2011; Kim and Im, 2011; Liu *et al.*, 2011; Haleem-Smith *et al.*, 2012; Venkatesan *et al.*, 2012; Neumann *et al.*, 2013). Of note, most of these studies were based on the use of vectors with low or short-term efficacies (nonviral or adenoviral vectors) (Ikeda *et al.*, 2004; Babister *et al.*, 2008; Steinert *et al.*, 2009, 2012; Kim and Im, 2011; Haleem-Smith *et al.*, 2012; Neumann *et al.*, 2013) or with a risk for insertional mutagenesis (retro-/lentiviral vectors) (Liu *et al.*, 2011). Vectors derived from recombinant adeno-associated virus (rAAV), instead, have several advantages over these other classes of gene vehicles as they are less toxic and immunogenic while allowing for high and persistent levels of transgene expression in human MSCs (hMSCs) by maintenance of the transgene mostly under the form of stable episomes, without altering the differentiation potential of such cells (Pagnotto *et al.*, 2007; Stender *et al.*, 2007; Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Interestingly, limited information is available on the precise mechanisms underlying hMSC chondrogenesis on rAAV gene transfer of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , one of the most potent factors for hMSC chondrogenesis. Ito and colleagues (2004) showed that production of TGF- $\beta$  in hMSCs from this class of vectors increased on ultraviolet light treatment without addressing the issue of cell differentiation, and Pagnotto and colleagues (2007) and Lee and colleagues (2011) reported stronger expression of cartilage matrix components with an rAAV TGF- $\beta$  using commercially available hMSCs at late passages (passage 35 cells) (Pagnotto *et al.*, 2007) or primary hMSCs embedded in a fibrin glue scaffold in short-term cultures (less than 1 week) (Lee *et al.*, 2011), without thoroughly analyzing the pathways involved.

The goal of the present study was therefore to expand the knowledge on the potential application of this key growth factor to modify primary hMSCs, also in light of our previous work showing the benefits of overexpressing TGF- $\beta$  via rAAV on the remodeling of human osteoarthritic cartilage *in situ* (Venkatesan *et al.*, 2013). Our results demonstrate that chondrogenic differentiation of hMSCs can be enhanced by high and prolonged levels of TGF- $\beta$  overexpression on rAAV gene transfer via the critical SOX9

chondrogenic pathway. However, as treatment with the TGF- $\beta$  vector also led to increased expression of hypertrophic and osteogenic markers, together with enhanced levels of  $\beta$ -catenin and Indian hedgehog and decreased parathyroid hormone-related protein (PTHrP) expression, regulated expression of rAAV TGF- $\beta$  will be a prerequisite to translate such a gene- and stem cell-based approach in experimental models of articular cartilage defects *in vivo*.

## Materials and Methods

### Reagents

Reagents were from Sigma (Munich, Germany) unless otherwise indicated. Recombinant FGF-2 (rFGF-2) and TGF- $\beta_3$  (rTGF- $\beta_3$ ) were purchased from Peprotech (Hamburg, Germany). Dimethylmethylene blue dye was from Serva (Heidelberg, Germany). Anti-TGF- $\beta$  (V), anti-SOX9 (C-20), anti-CD34 (C-18), anti-CD71 (C-20), anti-CD105 (T-20), and anti- $\beta$ -catenin (E-5) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Anti-type II collagen (II-II6B3) antibody was from the NIH Hybridoma Bank (University of Iowa, Ames, IA), anti-type I collagen antibody (AF-5610) was from Acris (Hiddenhausen, Germany), and anti-bromodeoxyuridine (BrdU) (BU-33) and anti-type X collagen (COL-10) antibodies were from Sigma. Biotinylated secondary antibodies and ABC reagent were obtained from Vector Laboratories (Alexis Deutschland, Grünberg, Germany). The TGF- $\beta$  ELISA (hTGF- $\beta$  Quantikine ELISA) was from R&D Systems (Wiesbaden, Germany), type II and type I collagen ELISAs (Arthrogen-CIA capture ELISAs) were from Chondrex (Redmond, WA), and the type X collagen ELISA (COL-10 ELISA) was from Antibodies-Online (Aachen, Germany). The cell proliferation reagent WST-1 was from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). The alkaline phosphatase (ALP) staining kit was from Sigma.

### Cell culture

Bone marrow aspirates (~15 ml) were obtained from the distal femurs of patients undergoing total knee arthroplasty (age, 70–74 years;  $n=12$ ). The study was approved by the Ethics Committee of the Saarland Physicians Council (Homburg, Germany). All patients provided informed consent before inclusion in the study and all procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration. hMSCs were isolated and expanded in culture according to standard protocols (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Briefly, aspirates were washed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and centrifuged, and the pellet was resuspended in red blood cell lysing buffer (Sigma) in DMEM (1:1). The resulting fraction was washed, pelleted, and resuspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) with penicillin (100 U/ml)–streptomycin (100  $\mu$ g/ml; pen-strep) (growth medium). Cells were plated in T75 flasks and maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The medium was exchanged after 24 hr and every 2–3 days thereafter, using growth medium with rFGF-2 (1 ng/ml). The cells were detached and replated for further experiments at appropriate densities. hMSCs were analyzed by flow cytometry for expression of stem cell surface markers (CD71<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD34<sup>−</sup>). All experiments

were performed with low-passage cells (not more than passage 2).

#### Plasmids and rAAV vectors

The constructs were all derived from the same parental AAV-2 genomic clone, pSSV9 (Samulski *et al.*, 1987, 1989). rAAV-*lacZ* carries the *lacZ* gene encoding *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) and rAAV-hTGF- $\beta$  a 1.2-kb human transforming growth factor  $\beta_1$  (hTGF- $\beta$ ) cDNA fragment, both under the control of the cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013). The vectors were packaged as conventional (not self-complementary) vectors using a helper-free, two-plasmid transfection system in 293 cells with the packaging plasmid pXX2 and the adenoviral helper plasmid pXX6 (Venkatesan *et al.*, 2013). Purification, dialysis, and titration of the vectors by real-time PCR were performed as previously described (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013), averaging  $10^{10}$  transgene copies/ml ( $\sim 1/500$  functional recombinant viral particles).

#### rAAV-mediated gene transfer

Monolayer cultures of undifferentiated hMSCs ( $2 \times 10^4$  cells) were transduced with rAAV (20  $\mu$ l of vector, i.e.,  $4 \times 10^5$  functional recombinant viral particles or a multiplicity of infection [MOI] of 20) and kept in growth medium for up to 21 days (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). hMSC aggregate cultures ( $2 \times 10^5$  cells) were prepared and kept in defined chondrogenic medium (DMEM high glucose [4.5 g/liter], pen-strep, insulin [6.25  $\mu$ g/ml], transferrin [6.25  $\mu$ g/ml], selenious acid [6.25  $\mu$ g/ml], linoleic acid [5.35  $\mu$ g/ml], bovine serum albumin [1.25  $\mu$ g/ml], 1 mM sodium pyruvate, ascorbate 2-phosphate [37.5  $\mu$ g/ml],  $10^{-7}$  M dexamethasone, TGF- $\beta_3$  [10 ng/ml]) for transduction (or not) with rAAV (40  $\mu$ l of vector, i.e.,  $8 \times 10^5$  functional recombinant viral particles or an MOI of 4) over a period of 21 days (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). For osteogenic and adipogenic differentiation, hMSCs in monolayer cultures ( $10^5$  cells) were transduced with rAAV (40  $\mu$ l of vector, i.e.,  $8 \times 10^5$  functional recombinant viral particles or an MOI of 8) and induced toward osteogenic differentiation using a StemPro osteogenesis differentiation kit or adipogenic differentiation using a StemPro adipogenesis differentiation kit (both from Life Technologies, Darmstadt, Germany) (Venkatesan *et al.*, 2012).

#### Transgene expression

To assess TGF- $\beta$  secretion, samples were washed twice and placed for 24 hr in serum-free medium. Supernatants were collected at the denoted time points and centrifuged to remove debris and TGF- $\beta$  production was measured by ELISA (Venkatesan *et al.*, 2013). Quantitative measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany). Transgene expression was also monitored by immunocytochemical and immunohistochemical analyses with a specific primary antibody (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013).

#### Biochemical assays

Cultures were harvested and aggregates were digested with papain (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Cell

proliferation was assessed with the cell proliferation reagent WST-1, with optical density (OD) proportional to the cell numbers (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012), and by immunolabeling after BrdU incorporation (3  $\mu$ g/ml for 24 hr) (Weimer *et al.*, 2012). DNA and proteoglycan contents were determined with a fluorimetric assay using Hoechst 22358 and by binding to dimethylmethylene blue dye, respectively (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013). Analysis of type II, I, and X collagen contents was performed by ELISA (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013). Data were normalized to total cellular protein, using a protein assay (Pierce Thermo Scientific, Fisher Scientific, Schwerte, Germany). All measurements were performed with a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan).

#### Histological, immunocytochemical, and immunohistochemical analyses

Monolayer and aggregate cultures were harvested and fixed in 4% formalin. Aggregates were further dehydrated in graded alcohols, embedded in paraffin, and sectioned (3  $\mu$ m). Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (cellularity), toluidine blue (matrix proteoglycans), and alizarin red (matrix mineralization) as previously described (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Expression of SOX9; type II, type I, and type X collagen; and  $\beta$ -catenin was detected by immunohistochemistry with specific primary antibodies, biotinylated secondary antibodies, and the ABC method with diaminobenzidine (DAB) as the chromogen (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Samples were also tested for transgene (TGF- $\beta$ ) expression and BrdU incorporation, using specific primary antibodies. To control for secondary immunoglobulins, sections were processed with omission of the primary antibody. Osteogenically induced cultures were stained for ALP activity and adipogenically differentiated cultures with oil red O to detect intracellular lipid droplets (Venkatesan *et al.*, 2012). Samples were examined by light microscopy (Olympus BX 45; Olympus, Hamburg, Germany).

#### Histomorphometry

Transduction efficiencies, the percentage of cells positive for BrdU uptake and for SOX9 and  $\beta$ -catenin expression, cell densities on H&E-stained sections, aggregate diameters, intensities of toluidine blue and alizarin red staining and those of type II, type I, and type X collagen immunostaining (all in pixels per standardized area) were measured at three random standardized sites or using 10 serial histologic and immunohistochemical sections for each parameter, test, and replicate condition, using the analySIS program (Olympus Soft Imaging Solutions [OSIS], Münster, Germany), Adobe Photoshop (Adobe Systems, Unterschleissheim, Germany), and Scion Image (Scion, Frederick, MD) (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). The percentages of areas stained for ALP or oil red O were calculated as being the ratios of positively stained surface to the total surface evaluated (Venkatesan *et al.*, 2012).

#### Real-time RT-PCR analyses

Total cellular RNA was extracted from cultures, using an RNeasy Protect mini kit with on-column RNase-free DNase

treatment (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was eluted in 30  $\mu$ l of RNase-free water. Reverse transcription was carried out with 8  $\mu$ l of eluate, using a first-strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV [avian myeloblastosis virus]) (Roche Applied Science). An aliquot of the cDNA product (2  $\mu$ l) was amplified by real-time PCR, using Brilliant SYBR Green QPCR master mix (Stratagene/Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on an Mx3000P QPCR operator system (Stratagene) as follows: (95°C, 10 min), amplification by 55 cycles (denaturation at 95°C, 30 sec; annealing at 55°C, 1 min; extension at 72°C, 30 sec), denaturation (95°C, 1 min), and final incubation (55°C, 30 sec). The primers (Invitrogen, Darmstadt, Germany) used were SOX9 (chondrogenic marker) (forward, 5'-ACACACAGCTCACTCGACCTTG-3'; reverse, 5'-GGGAATTCTGGTTGGTCTCT-3'), aggrecan (ACAN) (chondrogenic marker) (forward, 5'-GAGATGGAGGGTGAGGTC-3'; reverse, 5'-ACGCTGCCTCGGGCTTC-3'), type II collagen (COL2A1) (chondrogenic marker) (forward, 5'-GGACTTTTCTCCCTCTCT-3'; reverse, 5'-GACCCGAAGGTCTTACAGGA-3'), type I collagen (COL1A1) (osteogenic marker) (forward, 5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3'; reverse, 5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'), type X collagen (COL10A1) (marker of hypertrophy) (forward, 5'-CCCTCTTGTTAGTGCCAACC-3'; reverse, 5'-AGATTCCAGTCTTGGGTCA-3'), osteopontin (OP) (osteogenic marker) (forward, 5'-ACGCCGACCAAGGAAACTC-3'; reverse, 5'-GTCCATAAACCACACTATCACCTCG-3'), matrix metalloproteinase 13 (MMP13) (marker of terminal differentiation) (forward, 5'-AATTTTCACTTTGGCAATGA-3'; reverse, 5'-CAAATAATTATGAAAAGGGATGC-3'), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (osteogenic marker) (forward, 5'-GCAGTTCCCAGCATTTTCAT-3'; reverse, 5'-CACTCTGGCTTTGGGAAGAG-3'),  $\beta$ -catenin (mediator of the Wnt signaling pathway for osteoblast lineage differentiation) (forward, 5'-CAAGTGGGTGGTATAGAGG-3'; reverse, 5'-GCGGGACAAAGGCAAGA-3'), Indian hedgehog (IHH) (hypertrophy-associated marker) (forward, 5'-ATGAAGGCAAGATCGCTCG-3'; reverse, 5'-GATAGCCAGCGAGTTCAGG-3'), parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (anti-hypertrophic factor) (forward, 5'-CGACGACACACGCACCTTGAAAC-3'; reverse, 5'-CGACGCTCCACTGCTGAACC-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (housekeeping gene and internal control) (forward, 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'; reverse, 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3') (all 150 nM final concentration) (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012). Control conditions included reactions using water and non-reverse-transcribed mRNA. Specificity of the products was confirmed by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis. The threshold cycle ( $C_t$ ) value for each gene of interest was measured for each amplified sample, using MxPro QPCR software (Stratagene), and values were normalized to GAPDH expression by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, as previously described (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012).

#### Statistical analysis

Analysis under each condition was performed in triplicate in three independent experiments for each patient. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of separate experiments. The *t* test and Mann-Whitney rank-sum test

were used where appropriate. Any *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### *Sustained expression of TGF- $\beta$ in undifferentiated hMSCs via rAAV gene transfer*

hMSCs were first transduced with the candidate rAAV-hTGF- $\beta$  vector in undifferentiated monolayer cultures compared with a control condition (application of a reporter rAAV-*lacZ* gene vector) (Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012) to examine the ability of rAAV to mediate overexpression of the growth factor over time in these cells *in vitro* at an undifferentiated stage. Sustained, intense immunoreactivity to TGF- $\beta$  was detected in cells transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with the control treatment after 5 days (data not shown) and for up to 21 days, with transduction efficiencies of 80–87% (Fig. 1). This finding was corroborated by an analysis of the TGF- $\beta$  production levels in TGF- $\beta$ -transduced cells ( $17.2 \pm 0.4$  vs.  $4.5 \pm 0.2$  pg/ml/24 hr in *lacZ*-treated cells on day 14 and  $24.1 \pm 0.3$  pg/ml/24 hr vs. below the levels of detection on day 21, an at least 3.8-fold difference,  $p \leq 0.001$ ).

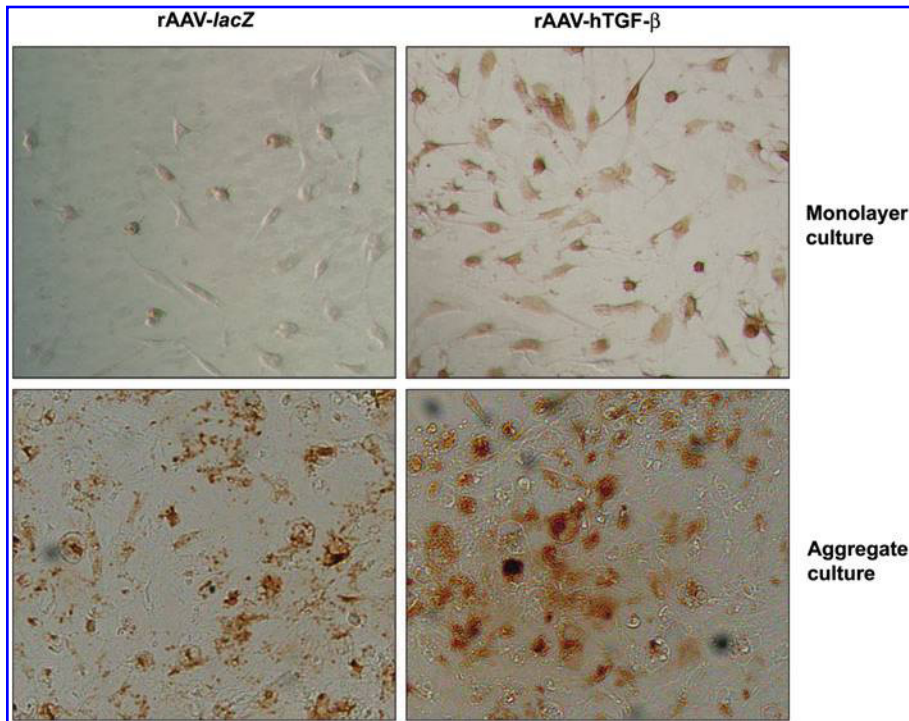
### *Effects of rAAV-hTGF- $\beta$ transduction on biological activities of undifferentiated hMSCs*

The candidate rAAV-hTGF- $\beta$  vector was next applied to undifferentiated monolayer cultures of hMSCs to investigate the effects of TGF- $\beta$  treatment on the biological activities of the cells (proliferation, matrix synthesis) compared with control *lacZ* treatment. An analysis using the WST-1 assay revealed significantly higher levels of proliferation mediated by rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* ( $\sim 0.417$  and  $0.108$  OD<sub>450nm</sub> in TGF- $\beta$ - vs. *lacZ*-treated cells on day 21, 3.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ). These results were corroborated when monitoring the DNA contents in the cultures ( $58.5 \pm 1.4$  and  $16.8 \pm 0.6$  ng/mg total protein in TGF- $\beta$ - vs. *lacZ*-treated cells on day 21, 3.5-fold difference,  $p \leq 0.001$ ). Further analyses also revealed that application of rAAV-hTGF- $\beta$  significantly increased the proteoglycan content in the cultures at the end of the evaluation period compared with *lacZ* treatment ( $12.9 \pm 1.5$  vs.  $4.4 \pm 0.6$   $\mu$ g/mg total protein on day 21, 2.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ).

### *Prolonged rAAV-mediated TGF- $\beta$ expression in chondrogenically differentiated hMSCs*

hMSCs were then transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  in chondrogenically induced aggregate cultures (again using rAAV-*lacZ* as the control condition as rAAV does not impair the potency of these cells [Cucchiari *et al.*, 2011; Pagnotto *et al.*, 2007; Venkatesan *et al.*, 2012]), in order to evaluate the ability of the candidate vector to promote the expression of TGF- $\beta$  over time in cells committed toward the chondrocyte phenotype. In agreement with the findings in monolayer cultures, a strong, durable signal specific to the growth factor was detected by immunohistochemistry in cells transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* for up to 21 days, with transduction efficiencies of 79–84% (Fig. 1). This result was also substantiated by an analysis of TGF- $\beta$  production levels in TGF- $\beta$ -transduced





**FIG. 1.** Transgene expression in rAAV-hTGF- $\beta$ -transduced undifferentiated and chondrogenically induced hMSCs. rAAV-hTGF- $\beta$  or rAAV-lacZ vector was applied to undifferentiated cells in monolayer culture (each vector, 20  $\mu$ l;  $n=6$  patients) or to chondrogenically induced cells (each vector, 40  $\mu$ l;  $n=6$  patients) as described in Materials and Methods and histologically processed after 21 days to monitor TGF- $\beta$  expression by immunocytochemical or immunohistochemical analysis (monolayer cultures: original magnification,  $\times 4$ ; aggregate cultures: original magnification,  $\times 20$ ; representative data are shown). Color images available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)

cells ( $268.3 \pm 1.9$  vs.  $115.4 \pm 0.7$  pg/ml/24 hr in lacZ-treated aggregates on day 21, 2.3-fold difference,  $p \leq 0.001$ ).

#### *Effects of rAAV-hTGF- $\beta$ treatment on biological activities and differentiation potential of chondrogenically induced hMSCs*

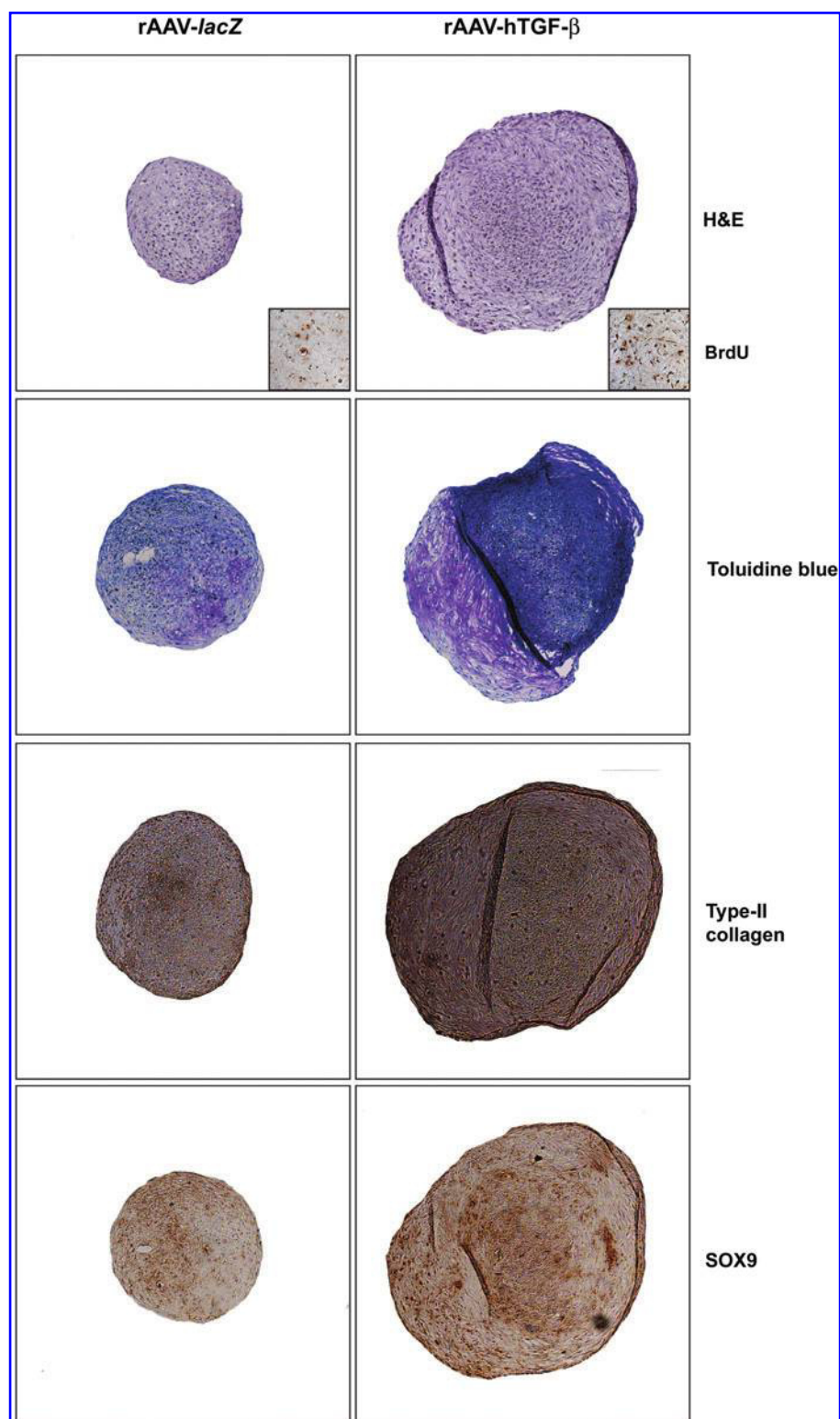
Cells were next transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  and induced in aggregate cultures toward chondrogenesis in order to examine the effects of TGF- $\beta$  treatment on the biological activities and chondrogenic differentiation potential of the cells versus the lacZ control condition. As we and others clearly reported that rAAV gene transfer does not impair the potency of hMSCs (Pagnotto *et al.*, 2007; Cucchiari *et al.*, 2011; Venkatesan *et al.*, 2012), we did not further include here a condition without vector treatment. An analysis by WST-1 assay revealed significantly higher levels of proliferation mediated by rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-lacZ ( $\sim 0.398$  and  $0.112$  OD<sub>450nm</sub> in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, 3.6-fold difference,  $p \leq 0.001$ ). These results were confirmed by an analysis of cell densities on H&E-stained sections from aggregates and of BrdU<sup>+</sup> cells on immunodetection of BrdU incorporation ( $1,870 \pm 392$  vs.  $1,531 \pm 263$  cells/mm<sup>2</sup> and  $74 \pm 3$  vs.  $39 \pm 2\%$  on day 21, respectively, between 1.2- and 1.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 2), or when monitoring the DNA content in the cultures ( $26.4 \pm 1.3$  and  $5.4 \pm 0.6$  ng/mg total protein in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, 4.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ). Also of note, application of the TGF- $\beta$  vector significantly increased the diameters of aggregates at the end of the period of evaluation compared with lacZ transduction ( $825 \pm 222$  vs.  $751 \pm 176$   $\mu$ m, 1.1-fold difference,  $p = 0.021$ ).

When samples were processed to monitor the metabolic and differentiation activities of hMSCs, successful chondrogenesis was noted on histological sections of aggregates

as evidenced by toluidine blue staining and type II collagen deposition, revealing more intense staining when the TGF- $\beta$  vector was applied ( $662 \pm 19$  vs.  $132 \pm 7$  and  $408 \pm 11$  vs.  $79 \pm 7$  pixels of toluidine blue staining and type II collagen immunostaining, respectively, in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, an up to 5.2-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 2). These results were substantiated by an evaluation of the proteoglycan and type II collagen contents in the aggregates ( $378.5 \pm 9.2$  and  $62.4 \pm 6.7$   $\mu$ g of proteoglycan/mg total protein and  $9.5 \pm 2.1$  and  $5.5 \pm 0.9$  ng of type II collagen/mg total protein in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, an up to 6.1-fold difference,  $p \leq 0.001$ ), possibly due to an increase in SOX9 expression promoted by TGF- $\beta$  gene transfer ( $79 \pm 2$  vs.  $41 \pm 3\%$  of SOX9-positive cells, respectively, in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, 1.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 2). An analysis of gene expression profiles by real-time RT-PCR further confirmed these findings (107-, 1.2-, and 42-fold higher SOX9, ACAN, and COL2A1 expression levels, respectively, in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates) (see Fig. 4A).

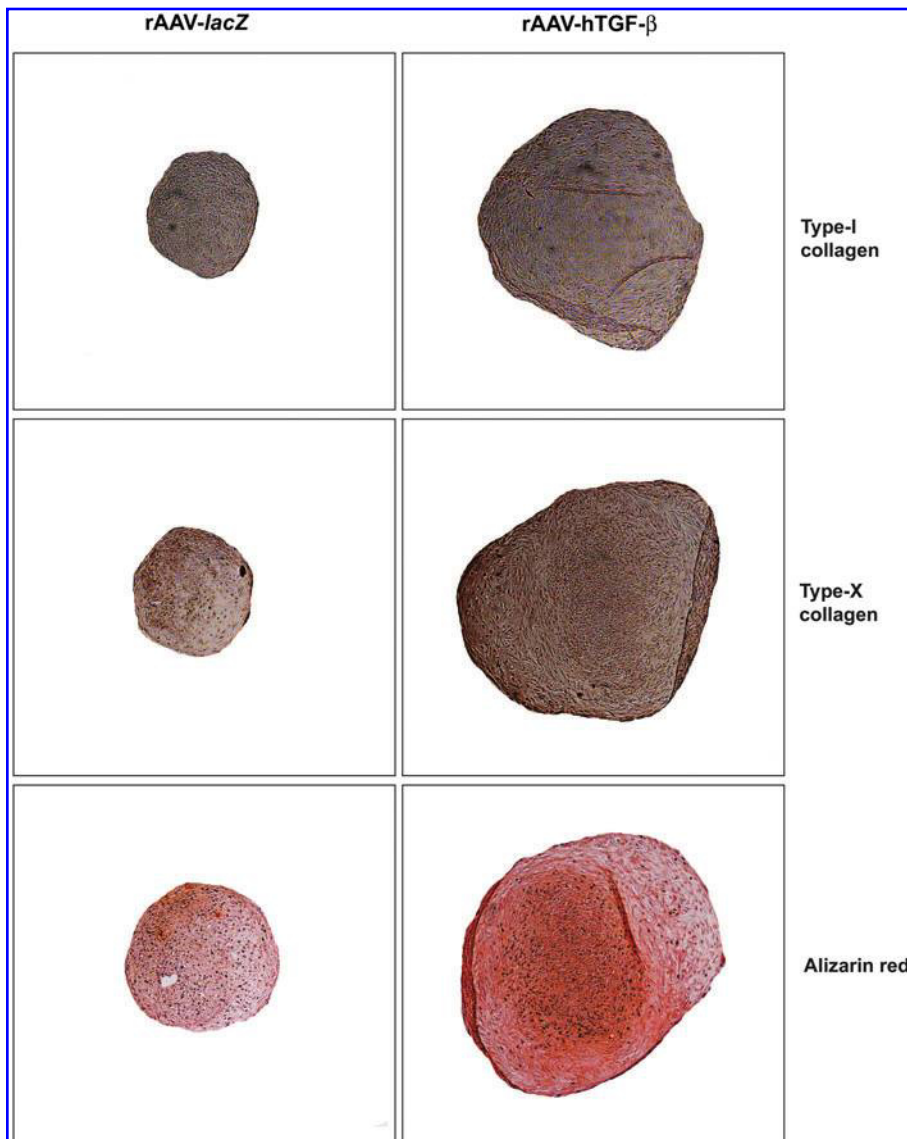
Interestingly, administration of the TGF- $\beta$  vector compared with lacZ led to increases in the intensity of type I and type X collagen immunostaining and of alizarin red staining ( $72 \pm 3$  vs.  $43 \pm 3$ ,  $75 \pm 2$  vs.  $41 \pm 2$ , and  $78 \pm 3$  vs.  $40 \pm 3$  pixels of type I and type X collagen immunostaining and alizarin red staining, respectively, in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, an up to 1.9-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 3). These results were corroborated by evaluation of the type I and type X collagen contents in the aggregates ( $17.2 \pm 3.7$  and  $13.1 \pm 2.3$   $\mu$ g of type I collagen/mg total protein and  $5.9 \pm 3.6$  and  $2.1 \pm 2.0$  ng of type X collagen/ng total protein in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates on day 21, 2.8-fold difference,  $p \leq 0.043$ ) and by real-time RT-PCR analysis for type X collagen (71-fold higher expression levels in TGF- $\beta$ - vs. lacZ-treated aggregates) without

**FIG. 2.** Metabolic and differentiation activities in chondrogenically induced cultures of hMSCs transduced with rAAV-hTGF- $\beta$ . hMSC aggregates were transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  or rAAV-*lacZ* ( $n=6$  patients) as described in Fig. 1 and histologically processed after 21 days to evaluate cellularity (H&E staining; *insets*: immunohistochemical detection of BrdU incorporation), the production of matrix proteoglycans (toluidine blue staining), and the expression of type II collagen and SOX9 (specific immunodetection) (original magnification,  $\times 4$ ; representative data are shown). Color images available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)



noticeable effect on type I collagen, using this approach (Fig. 4A). Such an analysis further revealed enhanced expression profiles for OP, MMP13, and RUNX2 on TGF- $\beta$  gene transfer compared with *lacZ* (2.6-, 2.4-, and 1.3-fold, respectively) (Fig. 4A). Remarkably, administration of TGF- $\beta$  led to increased expression levels for  $\beta$ -catenin

and IHH (always 1.2-fold) while decreasing those of PTHrP (2-fold) (Fig. 4A). Increased expression of  $\beta$ -catenin on TGF- $\beta$  treatment was also noted by immunohistochemical analysis ( $\sim 28$  vs. 17%  $\beta$ -catenin<sup>+</sup> cells compared with *lacZ*, i.e., a 1.6-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) revealing nuclear translocation (Fig. 4B).



**FIG. 3.** Hypertrophic differentiation in chondrogenically induced cultures of hMSCs transduced with rAAV-hTGF- $\beta$ . hMSC aggregates were transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  or rAAV-lacZ ( $n=6$  patients) as described in Fig. 1 and histologically processed after 21 days to evaluate the expression of type I and type X collagen (specific immunodetection) and matrix mineralization (alizarin red staining) (original magnification,  $\times 4$ ; representative data are shown). Color images available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)

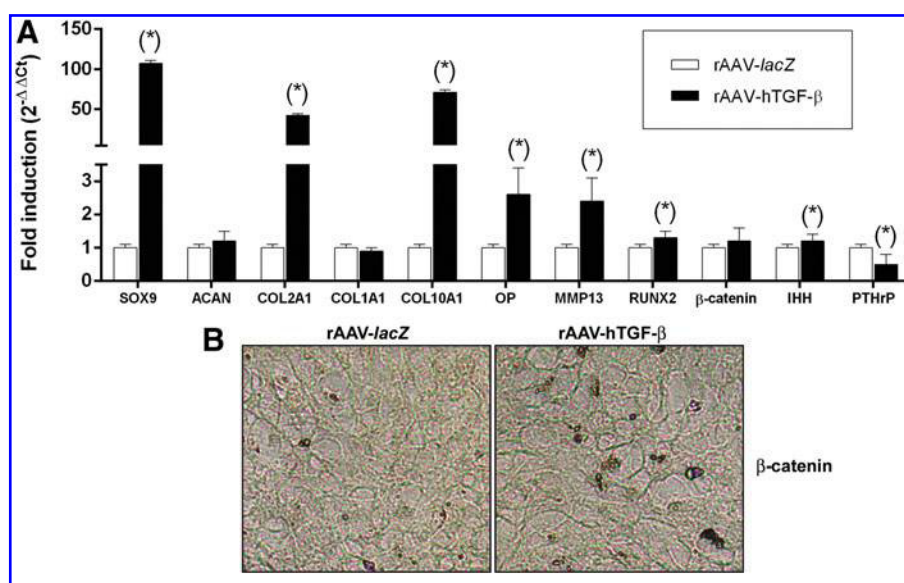
#### Effects of rAAV-hTGF- $\beta$ treatment on osteogenic and adipogenic differentiation potential of hMSCs

The candidate TGF- $\beta$  vector was next provided to osteogenically and adipogenically differentiated hMSCs over time to estimate further the effects of the growth factor via rAAV application on the potential for osteogenic and adipogenic differentiation of the cells compared with control lacZ treatment. Successful osteogenic differentiation was noted in the induced cultures as evidenced by ALP staining (Fig. 5). Notably, application of rAAV-hTGF- $\beta$  significantly increased the percentage of stained areas after 21 days compared with lacZ ( $73 \pm 3$  vs.  $52 \pm 2\%$ , 1.4-fold difference,  $p \leq 0.001$ ). Successful adipogenic differentiation was also achieved in the induced cultures as seen by the accumulation of lipid droplets after staining with oil red O (Fig. 5). Again, application of rAAV-hTGF- $\beta$  significantly increased the percentage of stained areas after 21 days compared with lacZ ( $76 \pm 2$  vs.  $33 \pm 2\%$ , 2.3-fold difference,  $p \leq 0.001$ ).

#### Discussion

The implantation of MSCs derived from bone marrow after genetic modification as a means to enhance their chondroregenerative properties is an attractive approach to improve the natural repair processes in articular cartilage defects (Cucchiari *et al.*, 2012; Johnstone *et al.*, 2013; Tuan, 2013). The goal of the present study was to transduce hMSCs, using highly effective rAAV vectors, to over-express TGF- $\beta$ , one of the most potent mediators of MSC chondrogenesis, in order to gain insights into the precise mechanisms controlled by this growth factor during the differentiation of rAAV-TGF- $\beta$ -modified hMSCs for future use as platforms for transplantation. Our data first demonstrate that highly efficient and prolonged expression of TGF- $\beta$  can be achieved in hMSCs via rAAV gene transfer both in undifferentiated and chondrogenically induced cultures for at least 21 days, with transduction efficiencies reaching up to 87%, concordant with previous findings using rAAV (Pagnotto *et al.*, 2007; Stender *et al.*, 2007; Cucchiari *et al.*,

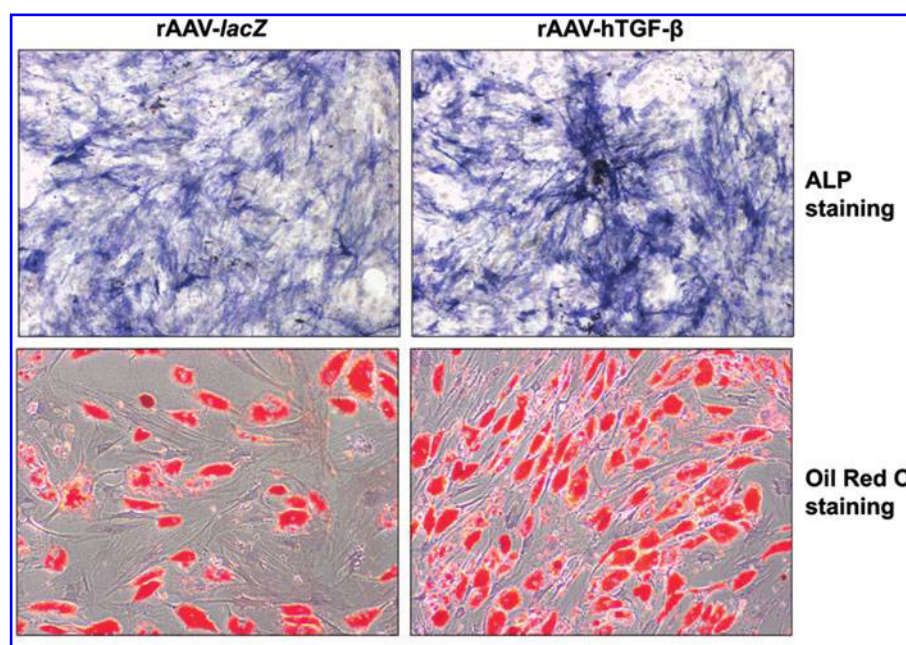




**FIG. 4.** Expression analyses in chondrogenically induced cultures of hMSCs transduced with rAAV-hTGF- $\beta$ . hMSC aggregates were transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  or rAAV-lacZ ( $n=6$  patients) as described in Fig. 1 and processed on day 21 (**A**) for gene expression analysis by real-time RT-PCR amplification after total cellular RNA extraction and cDNA synthesis and (**B**) to evaluate the expression of  $\beta$ -catenin (specific immunodetection) (original magnification,  $\times 40$ ; representative data) as described in Materials and Methods. The genes analyzed included the transcription factor SOX9; aggrecan (ACAN); types II, I, and X collagen (COL2A1, COL1A1, COL10A1); osteopontin (OP); matrix metalloproteinase 13 (MMP13); the transcription factor RUNX2;  $\beta$ -catenin; Indian hedgehog (IHH); and PTHrP, with GAPDH serving as a housekeeping gene and internal control (primers are listed in Materials and Methods).  $C_t$  values were obtained for each target and GAPDH as a control for normalization, and fold inductions (relative to lacZ-treated aggregates) were measured by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. Color images available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)

2011; Venkatesan *et al.*, 2012, 2013), as a probable result of the good maintenance of this vector type in its targets (Cucchiari *et al.*, 2012; Johnstone *et al.*, 2013). The levels of growth factor produced from our construct in undifferentiated hMSCs ranged between  $17.2 \pm 0.4$  and  $24.1 \pm 0.3$  pg of TGF- $\beta$ /ml from days 14 to 21 whereas Ito and colleagues (2004) reported levels of 350 pg/ml in such cells on day 3

with a similar vector. Although no data were available beyond this time point, it is important to note that these authors used much higher MOIs than those applied here (1000 vs. 20). In chondrogenically induced hMSC cultures, we observed levels of  $268.3 \pm 1.9$  pg of TGF- $\beta$ /ml after 21 days whereas Pagnotto and colleagues (2007) reported values of up to 10 ng/ml in a similar system after 2 weeks,



**FIG. 5.** Analyses in osteogenically and adipogenically differentiated cultures of hMSCs transduced with rAAV-hTGF- $\beta$ . Cells in monolayer cultures were transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  or rAAV-lacZ (each vector, 40  $\mu$ l;  $n=6$  patients) and induced toward osteogenic or adipogenic differentiation as described in Materials and Methods. Cultures were processed on day 21 for ALP staining (osteogenesis: original magnification,  $\times 4$ ; representative data are shown) and oil red O staining (adipogenesis: original magnification,  $\times 10$ ; representative data are shown). Color images available online at [www.liebertpub.com/hum](http://www.liebertpub.com/hum)

but again when applying high MOIs relative to ours ( $10^5$  vs. 4). Elevated amounts of TGF- $\beta$  have also been reported in hMSC aggregate cultures transduced with adenoviral vectors but only for relatively short periods of time (3–12 ng/ml at MOIs of 50–150 and 15–20 ng/ml at an MOI of 500 after 3 days, with undetectable levels by day 14, regardless of the MOI employed) (Kawamura *et al.*, 2005; Steinert *et al.*, 2012), in contrast with our findings at lower rAAV MOIs (MOI of 4 for at least 21 days).

The data further indicate that TGF- $\beta$  overexpression from rAAV vectors under the conditions applied here was capable of stimulating both proliferative and anabolic activities of hMSCs in undifferentiated monolayer cultures over a prolonged period of time (21 days), probably due to the long-term production of TGF- $\beta$  achieved with this stable class of vector. Similarly, treatment with the rAAV-TGF- $\beta$  vector increased the levels of proliferation in chondrogenically induced hMSCs while enhancing their differentiation potential compared with control (*lacZ*) treatment, as noted by higher expression and deposition of proteoglycans, aggrecan, and type II collagen in the presence of TGF- $\beta$ , consistent with previous findings in such cells (Mackay *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 1998; Pittenger *et al.*, 1999; Barry *et al.*, 2001; Kawamura *et al.*, 2005; Pagnotto *et al.*, 2007; Steinert *et al.*, 2012) and probably due to increases in the levels of chondrogenic SOX9 expression mediated by TGF- $\beta$  (Tuli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009). Interestingly, we report that administration of rAAV-TGF- $\beta$  led to enhanced expression of hypertrophic and osteogenic markers (type I and type X collagen, osteopontin) in hMSCs, concordant with the present findings on the osteogenic differentiation of these cells and with the properties of the growth factor when applied in a recombinant form or using less efficient (adenoviral) vectors (Mackay *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 1998; Barry *et al.*, 2001; Tuli *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Steinert *et al.*, 2012). These observations were possibly resulting from the increased levels of MMP13 (marker of terminal differentiation), RUNX2 (transcription factor controlling the osteoblastic expression of COL1, COL10, and MMP13),  $\beta$ -catenin (mediator of the Wnt pathway for osteogenic differentiation), and IHH (hypertrophy-associated marker) and of the decreased profile of PTHrP (anti-hypertrophic factor) in response to TGF- $\beta$  treatment as achieved via recombinant growth factor application (Tuli *et al.*, 2003; Ronziere *et al.*, 2010; Lee and Im, 2012). We finally show that TGF- $\beta$  gene transfer by rAAV enhanced the adipogenic differentiation of the cells, again in good agreement with findings based on adenoviral gene transfer (Steinert *et al.*, 2012).

In conclusion, the present findings show the potential of genetically modifying hMSCs via rAAV, using the potent TGF- $\beta$  factor as a tool to enhance MSC chondrogenesis in stem cell-based approaches for cartilage repair. Precise regulation of TGF- $\beta$  production levels will be critical to rule out premature terminal differentiation and ossification when translating the strategy in clinically relevant models of orthotopic cartilage defects *in vivo* that provide a natural microenvironment for chondrogenesis (Cucchiari *et al.*, 2005, 2013) rather than in ectopic systems (subcutaneous transplantation in the SCID mouse) lacking all joint tissues participating in the repair processes. Various options are available to address this issue, including the use of lower

vector doses, tissue-specific or regulatable promoters, and additional factors known to delay such processes (FGF-2, SOX transcription factors, anti-Cbfa-1 small interfering RNA) (Ikeda *et al.*, 2004; Cucchiari *et al.*, 2011; Kim and Im, 2011; Jeon *et al.*, 2012) that may be conveniently coadministered with TGF- $\beta$  via combinations of rAAV vectors (Cucchiari *et al.*, 2009). Independent studies will be required to identify and test the best suited promoter element and factor(s) that may prevent such unwanted effects and translate the approach to animal cells from the complex, clinically relevant selected orthotopic *in vivo* model, before the promise of the present work as an effective tool in future therapeutic strategies to repair damaged articular cartilage is fulfilled.

## Acknowledgments

This research was funded by grants from the German Osteoarthritis Foundation (Deutsche Arthrose-Hilfe e.V.). The authors thank R.J. Samulski (Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC), X. Xiao (Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA), and E.F. Terwilliger (Division of Experimental Medicine, Harvard Institutes of Medicine and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) for providing the genomic AAV-2 plasmid clones, the pXX2 and pXX6 plasmids, and the 293 cell line.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- Babister, J.C., Tare, R.S., Green, D.W., *et al.* (2008). Genetic manipulation of human mesenchymal progenitors to promote chondrogenesis using “bead-in-bead” polysaccharide capsules. *Biomaterials* 29, 58–65.
- Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., and Murphy, J.M. (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.* 268, 189–200.
- Bentley, G., Biant, L.C., Carrington, R.W., *et al.* (2003). A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 223–230.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., *et al.* (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895.
- Buckwalter, J.A. (1998). Articular cartilage: Injuries and potential for healing. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 28, 192–202.
- Cucchiari, M., Madry, H., Ma C., *et al.* (2005). Improved tissue repair in articular cartilage defects *in vivo* by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol. Ther.* 12, 229–238.
- Cucchiari, M., Terwilliger, E.F., Kohn, D., and Madry, H. (2009). Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 2476–2488.
- Cucchiari, M., Ekici, M., Schetting, S., *et al.* (2011). Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng. Part A* 17, 1921–1933.



- Cucchiari, M., Venkatesan, J.K., Ekici, M., *et al.* (2012). Human mesenchymal stem cells overexpressing therapeutic genes: From basic science to clinical applications for articular cartilage repair. *Biomed. Mater. Eng.* 22, 197–208.
- Cucchiari, M., Orth, P., and Madry, H. (2013). Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy *in vivo*. *J. Mol. Med.* 91, 625–636.
- Haleem-Smith, H., Calderon, R., Song, Y., *et al.* (2012). Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 1245–1252.
- Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., *et al.* (2003). Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint: A prospective, comparative trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A, 185–192.
- Hunziker, E.B. (2002). Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., *et al.* (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 3561–3573.
- Ito, H., Goater, J.J., Tiyyapattanaputi, P., *et al.* (2004). Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 11, 34–41.
- Jeon, S.Y., Park, J.S., Yang, H.N., *et al.* (2012). Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* 33, 4413–4423.
- Johnstone, B., and Yoo, J.U. (1999). Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 367(Suppl.), S156–S162.
- Johnstone, B., Alini, M., Cucchiari, M., *et al.* (2013). Tissue engineering for articular cartilage repair—the state of the art. *Eur. Cell Mater.* 25, 248–267.
- Kawamura, K., Chu, C.R., Sobajima, S., *et al.* (2005). Adenoviral-mediated transfer of TGF- $\beta_1$  but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp. Hematol.* 33, 865–872.
- Kim, H.J., and Im, G.I. (2011). Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 20, 2103–2114.
- Kim, H.J., Kim, Y.J., and Im, G.I. (2009). Is continuous treatment with transforming growth factor- $\beta$  necessary to induce chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells? *Cells Tissues Organs* 190, 1–10.
- Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T.C., *et al.* (2004). Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee: A randomized trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A, 455–464.
- Lee, H.H., Haleem, A.M., Yao, V., *et al.* (2011). Release of bioactive adeno-associated virus from fibrin scaffolds: Effects of fibrin glue concentrations. *Tissue Eng. Part A* 17, 1969–1978.
- Lee, J.M., and Im, G.I. (2012). PTHrP isoforms have differing effect on chondrogenic differentiation and hypertrophy of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 819–824.
- Liu, T.M., Guo, X.M., Tan, H.S., *et al.* (2011). Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum.* 63, 2711–2720.
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., *et al.* (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428.
- Mendes, S.C., Tibbe, J.M., Veenhof, M., *et al.* (2002). Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: Effect of culture conditions and donor age. *Tissue Eng.* 8, 911–920.
- Murphy, J.M., Dixon, K., Beck, S., *et al.* (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 704–713.
- Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A., and Easley, K.A. (2001). Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J. Orthop. Res.* 19, 117–125.
- Neumann, A.J., Alini, M., Archer, C.W., and Stoddart, M.J. (2013). Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng. Part A* 19, 1285–1294.
- O'Driscoll, S.W. (1998). The healing and regeneration of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80, 1795–1812.
- Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., *et al.* (2014). Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* 7, 1–17.
- Pagnotto, M.R., Wang, Z., Karpie, J.C., *et al.* (2007). Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- $\beta_1$  to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther.* 14, 804–813.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., *et al.* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Ronzière, M.C., Perrier, E., Mallein-Gerin, F., and Freyria, A.M. (2010). Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater. Eng.* 20, 145–158.
- Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised *in vitro* and its use to study viral replication. *J. Virol.* 61, 3096–3101.
- Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: Normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.* 63, 3822–3828.
- Steinert, A.F., Proffen, B., Kunz, M., *et al.* (2009). Hypertrophy is induced during the *in vitro* chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res. Ther.* 11, R148–R162.
- Steinert, A.F., Weissenberger, M., Kunz, M., *et al.* (2012). Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res. Ther.* 14, R168–R180.
- Stender, S., Murphy, M., O'Brien, T., *et al.* (2007). Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur. Cell Mater.* 13, 93–99.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919–926.
- Tibesku, C.O., Szuwart, T., Kleffner, T.O., *et al.* (2004). Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J. Orthop. Res.* 22, 1210–1214.

- Tuan, R.S. (2013) Regenerative medicine in 2012: The coming of age of musculoskeletal tissue engineering. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 74–76.
- Tuli, R., Tuli, S., Nandi, S., *et al.* (2003). Transforming growth factor- $\beta$ -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J. Biol. Chem.* 278, 41227–41236.
- Venkatesan, J.K., Ekici, M., Madry, H., *et al.* (2012). SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 3, 22–36.
- Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., *et al.* (2013) rAAV-mediated overexpression of TGF- $\beta$  stably restructures human osteoarthritic articular cartilage *in situ*. *J. Transl. Med.* 11, 211–224.
- Weimer, A., Madry, H., Venkatesan, J.K., *et al.* (2012). Benefits of rAAV-mediated IGF-I overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol. Med.* 18, 346–358.
- Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., *et al.* (1998). The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80, 1745–1757.

Address correspondence to:

Dr. Magali Cucchiari  
Center of Experimental Orthopaedics  
Saarland University Medical Center  
Kirrbergerstr. Bldg 37  
D-66421 Homburg/Saar  
Germany

E-mail: mmcucchiari@hotmail.com

Received for publication July 21, 2014;  
accepted after revision October 10, 2014.

Published online: October 21, 2014.

This article has been cited by:

1. Ke Tao, Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, Jianhao Lin, Magali Cucchiari. 2016. Co-overexpression of TGF- $\beta$  and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7. . [\[CrossRef\]](#)
2. Ana Rey-Rico, Magali Cucchiari. 2016. Recent tissue engineering-based advances for effective rAAV-mediated gene transfer in the musculoskeletal system. *Bioengineered* 00-00. [\[CrossRef\]](#)
3. Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh Kumar Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, Magali Cucchiari. 2016. TGF- $\beta$  gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20:10.1111/jcmm.2016.20.issue-3, 430-440. [\[CrossRef\]](#)
4. J Frisch, A Rey-Rico, J K Venkatesan, G Schmitt, H Madry, M Cucchiari. 2016. rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF- $\beta$  and IGF-I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair. *Gene Therapy* 23, 247-255. [\[CrossRef\]](#)
5. K.I. Papadopoulos, P. Wattanaarsakit, W. Prasongchean, R. Narain. Gene therapies in clinical trials 231-256. [\[CrossRef\]](#)
6. P. Díaz-Rodríguez, A. Rey-Rico, H. Madry, M. Landin, M. Cucchiari. 2015. Effective genetic modification and differentiation of hMSCs upon controlled release of rAAV vectors using alginate/poloxamer composite systems. *International Journal of Pharmaceutics* 496, 614-626. [\[CrossRef\]](#)
7. Magali Cucchiari, Christel Henrionnet, Didier Mainard, Astrid Pinzano, Henning Madry. 2015. New trends in articular cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics* 2. . [\[CrossRef\]](#)
8. Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Janina Frisch, Isabel Rial-Hermida, Gertrud Schmitt, Angel Concheiro, Henning Madry, Carmen Alvarez-Lorenzo, Magali Cucchiari. 2015. PEO-PPO-PEO micelles as effective rAAV-mediated gene delivery systems to target human mesenchymal stem cells without altering their differentiation potency. *Acta Biomaterialia* 27, 42-52. [\[CrossRef\]](#)
9. Ana Rey-Rico, Jagadeesh K. Venkatesan, Janina Frisch, Gertrud Schmitt, Amália Monge-Marcet, Patricia Lopez-Chicon, Alvaro Mata, Carlos Semino, Henning Madry, Magali Cucchiari. 2015. Effective and durable genetic modification of human mesenchymal stem cells via controlled release of rAAV vectors from self-assembling peptide hydrogels with a maintained differentiation potency. *Acta Biomaterialia* 18, 118-127. [\[CrossRef\]](#)
10. Jin Shang, Xin Fan, Lei Shangguan, Huan Liu, Yue Zhou. 2015. Global Gene Expression Profiling and Alternative Splicing Events during the Chondrogenic Differentiation of Human Cartilage Endplate-Derived Stem Cells. *BioMed Research International* 2015, 1-11. [\[CrossRef\]](#)

ORIGINAL ARTICLE

# Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow Aspirates upon rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I

Janina Frisch, PS,<sup>1</sup> Ana Rey-Rico, PhD,<sup>1</sup> Jagadeesh Kumar Venkatesan, PhD,<sup>1</sup> Gertrud Schmitt, MS,<sup>1</sup> Henning Madry, MD,<sup>1,2</sup> and Magali Cucchiari, PhD<sup>1</sup>

Direct therapeutic gene transfer in marrow concentrates is an attractive strategy to conveniently enhance the chondrogenic differentiation processes as a means to improve the healing response of damaged articular cartilage upon reimplantation in sites of injury. In the present study, we evaluated the ability of the clinically adapted recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors to mediate overexpression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) in human bone marrow aspirates that may modulate the proliferative, anabolic activities, and chondrogenic differentiation potential in such samples *in vitro*. The results demonstrate that successful, significant rAAV-mediated IGF-I gene transfer and expression were achieved in transduced aspirates (up to  $105.9 \pm 35.1$  pg rhIGF-I/mg total proteins) over time (21 days) at very high levels ( $\sim 80\%$  of cells expressing the candidate IGF-I transgene), leading to increased levels of proliferation, matrix synthesis, and chondrogenic differentiation over time compared with the control (*lacZ*) condition. Treatment with the candidate IGF-I vector also stimulated the hypertrophic and osteogenic differentiation processes in the aspirates, suggesting that the regulation of IGF-I expression through rAAV will be a prerequisite for future translation of the approach *in vivo*. However, these findings show the possible benefits of this vector class to directly modify marrow concentrates as a convenient tool for strategies that aim at improving the repair of articular cartilage lesions.

## Introduction

**I**NJURED, ADULT ARTICULAR cartilage like, during trauma or osteoarthritis does not possess an intrinsic ability for full repair<sup>1</sup> due to the lack of vascularization in this tissue that potentially may provide reparative progenitor cells in sites of cartilage damage. Several therapeutic options are available to treat articular cartilage defects, including autologous chondrocyte implantation and marrow-stimulating techniques,<sup>2–5</sup> but these procedures generally lead to the production of a fibrocartilaginous repair tissue (type-I collagen) of lesser quality than the natural hyaline cartilage (type-II collagen, proteoglycans) that does not integrate well with the surrounding unaffected cartilage, and cannot withstand mechanical stress.<sup>5–7</sup>

Such issues have been addressed, at least in part, by elaborating progenitor cell-based therapies for cartilage repair by the administration of isolated chondroregenerative cells like bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs)<sup>5,8,9</sup> or of marrow concentrates containing MSCs among various cell subpopulations (hematopoietic cells,

fibroblasts) as a single-step, convenient therapeutic procedure<sup>10–12</sup> due to the extensive, specific ability of MSCs to undergo competent chondrogenic differentiation in this environment.<sup>13–15</sup> Nevertheless, even though the clinical outcomes of such trials have been encouraging, complete reconstruction of an original cartilaginous surface in treated patients has not been reported to date, demonstrating the clear need for improved protocols.<sup>5</sup> In this regard, approaches based on the transfer of sequences coding for chondrogenic and/or chondroregenerative factors may offer strong tools to enhance the healing response of the articular cartilage through transplantation of genetically modified isolated or concentrated progenitor cells.<sup>16</sup> While a broad number of therapeutic candidates have been evaluated to target isolated MSCs (cartilage oligomeric matrix protein, COMP; transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ; bone morphogenetic proteins, BMPs; insulin-like growth factor I, IGF-I; basic fibroblast growth factor, FGF-2; Indian hedgehog, IHH; human telomerase, hTERT; small interfering RNA (siRNA) against p53; SOX transcription factors; anti-Runx2/Cbfa1 siRNA; zinc-finger protein

<sup>1</sup>Center of Experimental Orthopaedics and <sup>2</sup>Department of Orthopedic Surgery, Saarland University Medical Center, Homburg/Saar, Germany.

145, ZNF145),<sup>17–33</sup> relatively few information is available on the feasibility of translating the method to marrow concentrates as a less invasive treatment strategy. Most notably, Pascher *et al.*<sup>34</sup> and Ivkovic *et al.*<sup>35</sup> employed adenoviral gene transfer to transduce marrow aspirates from rabbit and sheep, achieving relatively short-term levels of transgene expression in such samples *in vitro* (21 days). In marked contrast, we recently provided evidence that recombinant vectors derived from the human nonpathogenic, replication defective adeno-associated virus (AAV) are capable of effectively ( $\sim 90\%$  transduction efficiency) and persistently (up to 125 days) modify human marrow aspirates without deleterious effects *in vitro*,<sup>36</sup> in good agreement with the properties of the vectors (reduced toxicity and immunogenicity, maintenance of recombinant adeno-associated virus (rAAV) sequences as stable, safe episomes) that make them the currently preferred gene delivery system for clinical applications.<sup>16</sup>

In the present study, in light of our recent work showing the benefits of applying an rAAV IGF-I vector to modulate the proliferative, biosynthetic, and chondrogenic activities in isolated human MSCs,<sup>20</sup> we examined the ability of this vector to deliver and mediate the expression of this mitogenic and proanabolic growth factor in primary human bone marrow aspirates as a potential approach to enhance the chondrogenic differentiation processes in the samples. Our results show for the first time to the best of our knowledge that rAAV-mediated modification of human marrow aspirates to overexpress IGF-I, stimulates the biological and chondrogenic activities of the samples, probably due to the high and durable levels of growth factor production achieved with this vector class. Transduction with rAAV-hIGF-I had also an impact on hypertrophic and osteogenic differentiation, showing that regulation of growth factor expression through rAAV will be decisive to further provide modified aspirates in sites of cartilage damage *in vivo*.

## Materials and Methods

### Reagents

All reagents were purchased at Sigma unless otherwise indicated. The antibodies used for immunohistochemical analyses were as follows: anti-type-II collagen (II-II6B3; NIH Hybridoma Bank, University of Iowa), anti-type-I collagen (COL-1; Abcam), anti-type-X collagen (COL-10; Sigma), anti-IGF-I (AF-291-NA; R&D Systems), and anti-SOX9 (C-20; Santa Cruz Biotechnology). Secondary biotinylated antibodies and the ABC reagent were from Vector Laboratories (Alexis Deutschland GmbH). The dimethylmethylene blue dye was from Serva. Recombinant TGF- $\beta$ 3 was from Pepro-Tech. The IGF-I ELISA (hIGF-I Quantikine ELISA) was from R&D System. The type-II and type-I collagen ELISAs (CUSABIO) and the type-X collagen ELISA (Cloud-Clone Corp.) were obtained at antibodies-online GmbH.

### Plasmids and rAAV vectors

The parental AAV-2 genomic clone pSSV9<sup>37,38</sup> was used to create all constructs applied in this study. rAAV-*lacZ* carries the *lacZ* gene for *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase and rAAV-hIGF-I a human insulin-like growth factor I (hIGF-I) cDNA fragment (536 bp), both under the control of the cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter.<sup>20,36,39</sup> rAAV were

packaged as conventional (not self-complementary) vectors using the 293 adenovirus-transformed embryonic kidney cell line. Adenovirus 5 was used to provide helper functions in combination with the pAd8 helper plasmid as previously described.<sup>20,39</sup> The vectors were purified, dialyzed, and titrated by real-time polymerase chain reaction (PCR),<sup>20,39</sup> averaging  $10^{10}$  transgene copies/mL.

### rAAV-mediated gene transfer

Bone marrow aspirates ( $\sim 15$  mL;  $1.4 \pm 0.4 \times 10^9$  cells/mL) were obtained from the distal femurs of patients undergoing total knee arthroplasty ( $n=8$ , age  $68 \pm 10$  years). All patients provided informed consent before inclusion in the study and all procedures were in accordance with the Helsinki Declaration. The study was approved by the Ethics Committee of the Saarland Physicians Council. The aspirates containing MSCs<sup>34–36</sup> were aliquoted in standard tissue culture plastic 96-well plates (100  $\mu$ L of aspirate/well) and immediately transduced with the rAAV vectors by mixing 40  $\mu$ L of vector solution with each aliquot (i.e.,  $8 \times 10^5$  functional recombinant viral particles,  $\text{MOI} = 10 \pm 3$ ) and then adding 50  $\mu$ L of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) for an incubation time of 1.5 h at  $37^\circ\text{C}$  under  $5\% \text{ CO}_2$ . A volume of 60  $\mu$ L of chondrogenic medium (4.5 g/L DMEM high glucose, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ L/mL streptomycin, 6.25  $\mu$ g/mL insulin, 6.25  $\mu$ g/mL transferrin, 6.25  $\mu$ g/mL selenious acid, 5.35  $\mu$ g/mL linoleic acid, 1.25  $\mu$ g/mL bovine serum albumin, 1 mM sodium pyruvate, 37.5  $\mu$ g/mL ascorbate 2-phosphate,  $10^{-7}$  M dexamethasone, and 10 ng/mL TGF- $\beta$ 3) was then added per aspirate for an incubation at  $37^\circ\text{C}$  under  $5\% \text{ CO}_2$  for up to 21 days based on work adapted for cartilage repair<sup>20,36</sup> with medium change performed once per week for MSC chondrogenesis.<sup>34–36</sup> To avoid attachment on the bottom of the plates, the aspirates were carefully mixed after each medium change. For osteogenic and adipogenic differentiation, the aspirates were transduced using similar conditions as those described above and then induced either toward osteogenic differentiation using the StemPro Osteogenesis Differentiation Kit or adipogenic differentiation using the StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (both from Life Technologies GmbH).<sup>20,32</sup>

### Detection of transgene expression

To assess IGF-I secretion, 30  $\mu$ L of each aspirate supernatant were collected at the denoted time points 24 h after medium change and centrifuged to remove debris, and IGF-I production was measured by ELISA as previously described.<sup>20,39</sup> Quantitative measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan). Transgene expression was also monitored by immunohistochemical analysis using a specific primary antibody.<sup>20,36,39</sup>

### Histological, immunocytochemical, and immunohistochemical analyses

The aspirates were collected, fixed in 4% formalin, dehydrated in graded alcohols, embedded in paraffin, and sectioned (3  $\mu$ m). Sections were stained with Hematoxylin and eosin (H&E) for cellularity, Toluidine blue for matrix proteoglycans, and Alizarin Red for matrix mineralization as previously described.<sup>19,20,32,36</sup> Immunohistochemistry was performed to monitor the expression



of IGF-I, type-II, type-I, and type-X collagen, and SOX9 using specific primary antibodies, biotinylated secondary antibodies, and the ABC method with diaminobenzidine as the chromogen.<sup>19,20,32,36</sup> To control for secondary immunoglobulins, sections were processed with omission of the primary antibody. Samples were examined under light microscopy (Olympus BX 45; Olympus).

#### Histomorphometry

The levels of cells expressing the transgene (% of cells positive for IGF-I expression—i.e., IGF-I<sup>+</sup> cells—to the total numbers of cells), the cell densities on H&E-stained sections, the intensities of Toluidine blue and Alizarin Red staining and of type-II, type-I, and type-X collagen, and SOX9 immunostaining, and the densities of cells stained for Toluidine blue were monitored at 3 random standardized sites or with 10 serial histological and immunohistochemical sections for each parameter, test, and replicate condition using the SIS analysis program (Olympus), Adobe Photoshop (Adobe Systems), and Scion Image (Scion Corporation).<sup>19,20,32,36</sup> To evaluate IGF-I expression, only cells strongly stained versus (faint) background diaminobenzidine (DAB) signal, that is, in the absence of primary antibody, were considered as IGF-I<sup>+</sup>. Regarding the measurements of the cell densities, H&E-stained sections from either *lacZ*- or IGF-I-treated aspirates were analyzed by counting cells per standardized area using a similar magnification (×40) for all types of samples to allow for strict comparison. To monitor the staining intensities, ×20 images were first converted to inverted grayscale mode. Background DAB signal was adapted for comparable range of each type of immunostaining before evaluations. The total areas (mm<sup>2</sup>) covered with cells were next measured to identify the average gray value of the defined area. Data are given as mean intensity of staining or immunostaining per mm<sup>2</sup> of total cell area. To generate the % of Toluidine blue-positive cells, the densities of cells stained for Toluidine blue per mm<sup>2</sup> of the total cell area were normalized to the cell densities per mm<sup>2</sup> of the total cell areas assessed on H&E-stained sections.

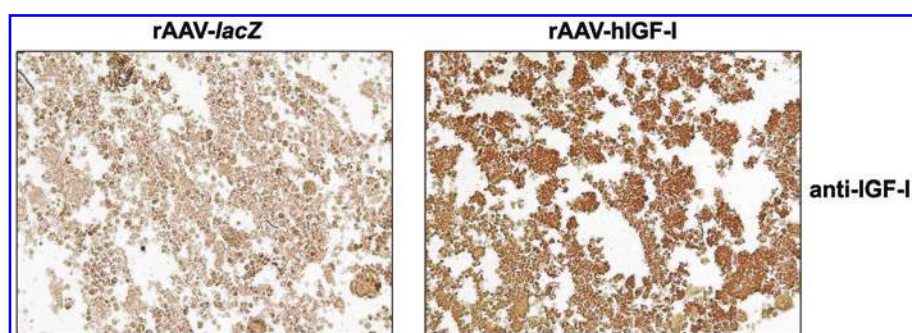
#### Biochemical assays

The aspirates were collected and digested with papain.<sup>19,20,32</sup> A fluorimetric assay using Hoechst 22358 was applied to determine the DNA contents and the proteoglycans were measured by binding to dimethylmethylene blue dye.<sup>19,20,32</sup> Analysis of the type-II, type-I, and type-X collagen contents were performed by respective ELISAs.<sup>19,20,32</sup> Total cellular proteins were monitored through protein assay (Pierce Thermo Scientific, Fisher Scientific) and subsequently used to normalize the biochemical data. All measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan). Osteogenically and adipogenically induced aspirates were processed for quantitative estimation of the alkaline phosphatase (ALP) activities and Oil Red O staining, respectively.<sup>40–42</sup> Determination of ALP activity was performed by mixing 100 µL of osteogenically differentiated aspirate with an equal volume of substrate buffer (4 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate—pNPP—mixed 1:1 with 4.8% 2-amino-2-methyl-1-propanol—2-AMP) and measuring OD<sup>530nm</sup> as previously described.<sup>40</sup> Estimation of Oil Red O staining was performed by mixing 100 µL of adipogenically induced aspirate with 150 µL of staining solution (three

volumes of Oil Red O 0.3% in 2-propanol and two volumes H<sub>2</sub>O) for 15 min at room temperature followed by dissolution in 100% 2-propanol and by measuring OD<sup>530nm</sup>.<sup>40–42</sup>

#### Real-time RT-PCR analyses

Total cellular RNA was extracted from all the aspirates at the denoted time points using TRIzol reagent (Ambion® Life Technologies) and the RNeasy Protect Mini Kit with an on-column RNase-free DNase treatment (Qiagen) and RNA elution in 30 µL RNase-free water. Eight microliters of eluate were applied to perform reverse transcription by using the First Strand cDNA Synthesis Kit for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) (AMV) (Roche Applied Science). Real-time PCR was carried out to amplify 2 µL of the cDNA product by using the Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies) on an Mx3000P QPCR operator system (Stratagene) as follows: (95°C, 10 min), amplification by 55 cycles (denaturation at 95°C, 30 s; annealing at 55°C, 1 min; extension at 72°C, 30 s), denaturation (95°C, 1 min), and final incubation (55°C, 30 s). All primers were purchased at Invitrogen: SOX9 (chondrogenic marker) (forward 5'-ACACACAGCTCACTCGACCTTG-3'; reverse 5'-GGGAATTCTGGTTGGTCTCT-3'), type-II collagen (COL2A1) (chondrogenic marker) (forward 5'-GGACTTTTCTCCCC TCTCT-3'; reverse 5'-GACCCGAAGGTCTTACAGGA-3'), aggrecan (ACAN) (chondrogenic marker) (forward 5'-GAGATGGAGGGTGAGGTC-3'; reverse 5'-ACGCTGC CTCGGGCTTC-3'), type-I collagen (COL1A1) (osteogenic marker) (forward 5'-ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC-3'; reverse 5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'), type-X collagen (COL10A1) (marker of hypertrophy) (forward 5'-CCCTCTTGTTAGTGCCAACC-3'; reverse 5'-AGATTCCAGTCCTTGGGTCA-3'), matrix metalloproteinase 13 (MMP13) (marker of terminal differentiation) (forward 5'-AATTTTCACTTTTGGCAATGA-3'; reverse 5'-CAAATAATTTATGAAAAAGGGATGC-3'), ALP (osteogenic marker) (forward 5'-TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACC A-3'; reverse 5'-ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC-3'), osteopontin (OP) (osteogenic marker) (forward 5'-ACGC CGACCAAGGAAACTC-3'; reverse 5'-GTCCATAAAC CACACTATCACCTCG-3'), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (osteogenic marker) (forward 5'-GCAGTT CCAAGCATTTTCAT-3'; reverse 5'-CACTCTGGCTTT GGGAAGAG-3'), β-catenin (mediator of the Wnt signaling pathway for osteoblast lineage differentiation) (forward 5'-CAAGTGGGTGGTATAGAGG-3'; reverse 5'-GCGGGA CAAAGGGCAAGA-3'), Indian hedgehog (IHH) (hypertrophy-associated marker) (forward 5'-ATGAAGGCAAGA TCGCTCG-3'; reverse 5'-GATAGCCAGCGAGTTCAGG-3'), para thyroid hormone-related protein (PTHrP) (anti-hypertrophic factor) (forward 5'-CGACGACACACGCACT TGAAAC-3'; reverse 5'-CGACGCTCCACTGCTGAACC-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (housekeeping gene and internal control) (forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; reverse 5'-GAAGATGG TGATGGGATTTC-3') (all 150 nM final concentration).<sup>19,20,32</sup> Water and non-reverse-transcribed mRNA were used as control conditions. To confirm the specificity of the products, melting curve analysis and agarose gel electrophoresis were performed. The threshold cycle (Ct) value for each amplified



**FIG. 1.** Detection of insulin-like growth factor I (IGF-I) overexpression in human bone marrow aspirates through recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer. Aspirates were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-*lacZ* (40  $\mu$ L each vector) and kept in chondrogenic medium as described in the Materials and Methods section and processed after 21 days to detect IGF-I expression by immunohistochemical analysis (magnification  $\times 20$ , representative data). Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)

sample and each gene of interest was measured by using the MxPro QPCR software (Stratagene), and values were normalized to GAPDH expression by using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method as previously described.<sup>19,20,32</sup>

#### Statistical analyses

All conditions were performed in triplicates in three independent experiments for each patient and all patients were tested. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of separate experiments. Statistical significance was assessed for any *p*-value of less than 0.05 using the *t*-test and Mann-Whitney Rank Sum Test, where appropriate.

## Results

### Effective IGF-I gene transfer and overexpression through rAAV in human bone marrow aspirates

Bone marrow aspirates were first transduced with the candidate rAAV-hIGF-I vector compared with the control rAAV-*lacZ* vector to evaluate the ability of rAAV to mediate direct overexpression of the growth factor in conditions of chondrogenic differentiation. An analysis of IGF-I expression by immunohistochemistry revealed a significantly higher, sustained signal in rAAV-hIGF-I- versus rAAV-*lacZ*-treated aspirates for up to 21 days, the longest time point evaluated (Fig. 1), while faint staining was seen in any condition when omitting the primary antibody (not shown). These results were confirmed by an analysis of the IGF-I production levels assessed by ELISA, with significantly higher amounts of factor synthesized in the presence of rAAV-hIGF-I relative to rAAV-*lacZ* ( $p \leq 0.042$ ) in the presence of similar amounts of total proteins in the samples ( $p = 1.000$ ) (Table 1). The % of cells expressing IGF-I reached  $\sim 80\%$  with the rAAV IGF-I vector versus 10% in the control condition (endogenous IGF-I expression) (eight-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 1).

### Activation of the proliferative, biosynthetic activities, and chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates following application of rAAV-hIGF-I

Transduction was further performed in chondrogenic conditions to examine the potential effects of IGF-I overexpression through rAAV on the biological activities of human

bone marrow aspirates (proliferation, matrix synthesis) compared with control (*lacZ*) treatment. As we already reported that gene transfer with rAAV does not impair the differentiation potential of bone marrow aspirates,<sup>36</sup> we did not further include here a condition without vector treatment.

An histological analysis of the transduced aspirates by H&E staining revealed significantly higher cell densities in the IGF-I- versus *lacZ*-treated samples after 21 days ( $0.061 \pm 0.030$  compared with  $0.025 \pm 0.011$  cells/ $\mu\text{m}^2$  on day 21, i.e., a 2.4-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 2A). These results were corroborated by an estimation of the DNA contents in the aspirates (1.2-fold difference,  $p = 0.007$ ) (Fig. 2B).

Administration of rAAV-hIGF-I also significantly increased the homogeneous intensities of cell-associated Toluidine blue staining (Fig. 3A) and of type-II collagen and SOX9 immunostaining (Fig. 3B, C, respectively) versus rAAV-*lacZ* ( $1132.9 \pm 212.6$  vs.  $827.8 \pm 339.6$ ,  $827.9 \pm 76.5$  vs.  $679.3 \pm 49.6$ , and  $790.5 \pm 22.9$  vs.  $685.6 \pm 11.8$  mean intensity/ $\text{mm}^2$  total cell area on day 21 for Toluidine blue staining and for type-II collagen and SOX9 immunostaining, i.e., up to a 1.4-fold difference,  $p \leq 0.026$ ), with significantly enhanced % of Toluidine blue-positive cells in the presence of IGF-I ( $\sim 100\%$ ) versus *lacZ* ( $14\% \pm 3\%$ , i.e., about a seven-fold difference,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 3A). These findings were substantiated by an assessment of the proteoglycan and type-II collagen contents in the aspirates (1.5-fold difference for the proteoglycans,  $p = 0.022$ ; 1.3-fold difference for type-II collagen,  $p = 0.176$ ) (Fig. 3A, B). An analysis of the gene expression profiles by real-time RT-PCR revealed 19- ( $p = 0.001$ ), 14- ( $p = 0.040$ ), and 56-fold ( $p = 0.025$ ) higher ACAN, COL2A1, and SOX9 levels, respectively,

**TABLE 1.** DETECTION OF IGF-I EXPRESSION IN RAAV-TRANSDUCED HUMAN BONE MARROW ASPIRATES

Days posttransduction	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hIGF-I
7	61.1 $\pm$ 4.1 (11.7 $\pm$ 0.3)	97.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup> (10.2 $\pm$ 1.5)
14	36.9 $\pm$ 2.4 (13.2 $\pm$ 1.1)	49.2 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup> (12.5 $\pm$ 2.9)
21	85.5 $\pm$ 0.1 (12.6 $\pm$ 0.1)	105.9 $\pm$ 35.1 <sup>a</sup> (13.1 $\pm$ 0.8)

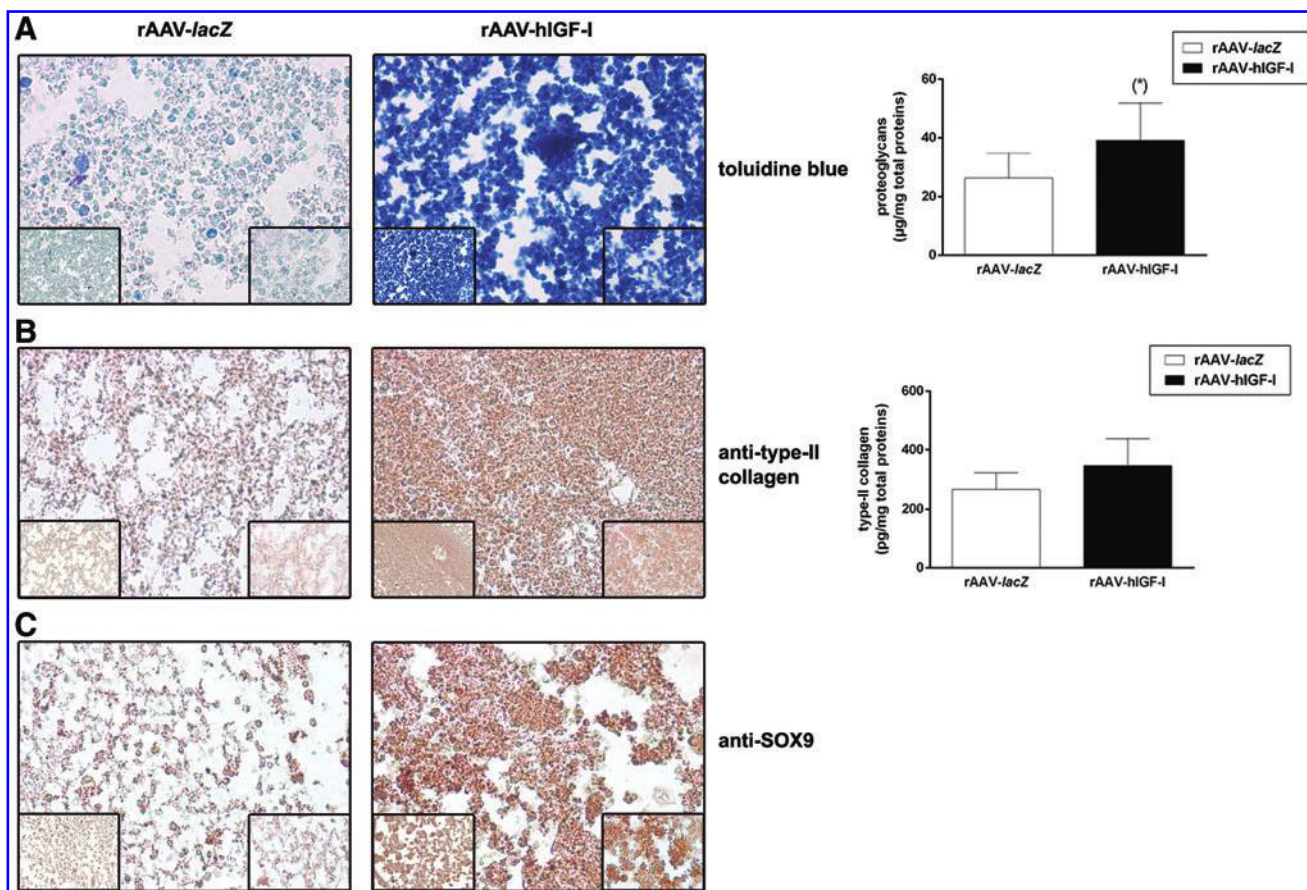
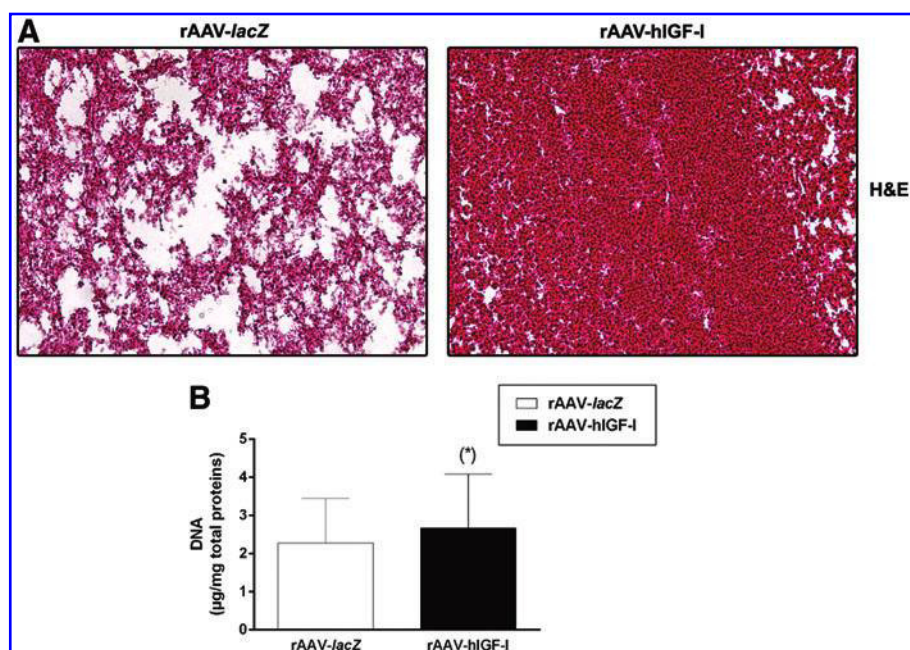
Values are expressed as mean pg rhIGF-I/mg total proteins  $\pm$  SD. Values in the brackets represent the mean total proteins (mg/mL)  $\pm$  SD.

<sup>a</sup>Statistically significant versus rAAV-*lacZ*.

IGF-I, insulin-like growth factor I; rAAV, recombinant adeno-associated virus; SD, standard deviation.



**FIG. 2.** Proliferative activities in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I. Aspirates were transduced and maintained in chondrogenic medium as described in Figure 1 and histologically processed after 21 days to monitor the levels of cell proliferation by (A) Hematoxylin and eosin (H&E) staining (magnification  $\times 20$ , representative data) and (B) biochemical assay (detection of the DNA contents). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)



**FIG. 3.** Biosynthetic activities and chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I. Aspirates were transduced and maintained in chondrogenic medium as described in Figure 1 and histologically processed after 21 days to monitor the levels and production of (A) proteoglycans (Toluidine blue staining and estimation of the contents), (B) type-II collagen (immunodetection and estimation of the contents), and (C) SOX9 (immunodetection) (magnification  $\times 40$ , insets left at magnification  $\times 20$ , insets right at magnification  $\times 100$ , representative data). \*Statistically significant compared with rAAV-lacZ. Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)

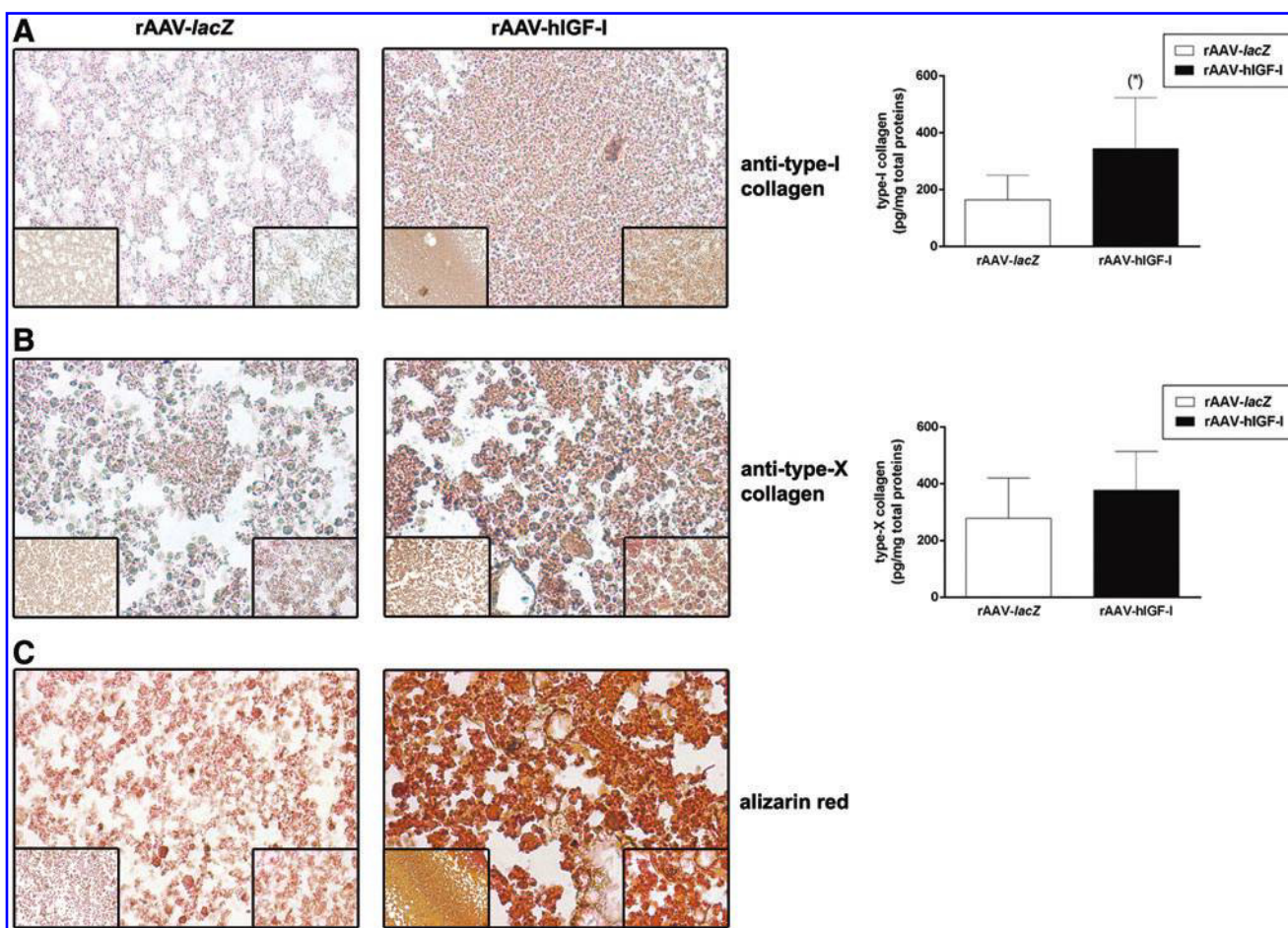


in the IGF-I- versus *lacZ*-treated aspirates after 21 days of chondrogenic induction (Fig. 5). An evaluation of the outcomes at day 21 versus day 1 per vector type showed over time increases in chondrogenic marker expression in both types of aspirates (ACAN: 652- and 15,027-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 23-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.008$ ; COL2A1: 2791- and 31,590-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 11-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.032$ ; SOX9: 4469- and 250,831-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 56-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.023$ ) (Fig. 5). Finally, treatment with IGF-I for 21 days enhanced the expression levels of these markers in the aspirates compared with samples treated with *lacZ* for 1 day (12,568-, 40,079-, and 252,058-fold for ACAN, COL2A1, and SOX9, respectively,  $p \leq 0.011$ ) (Fig. 5).

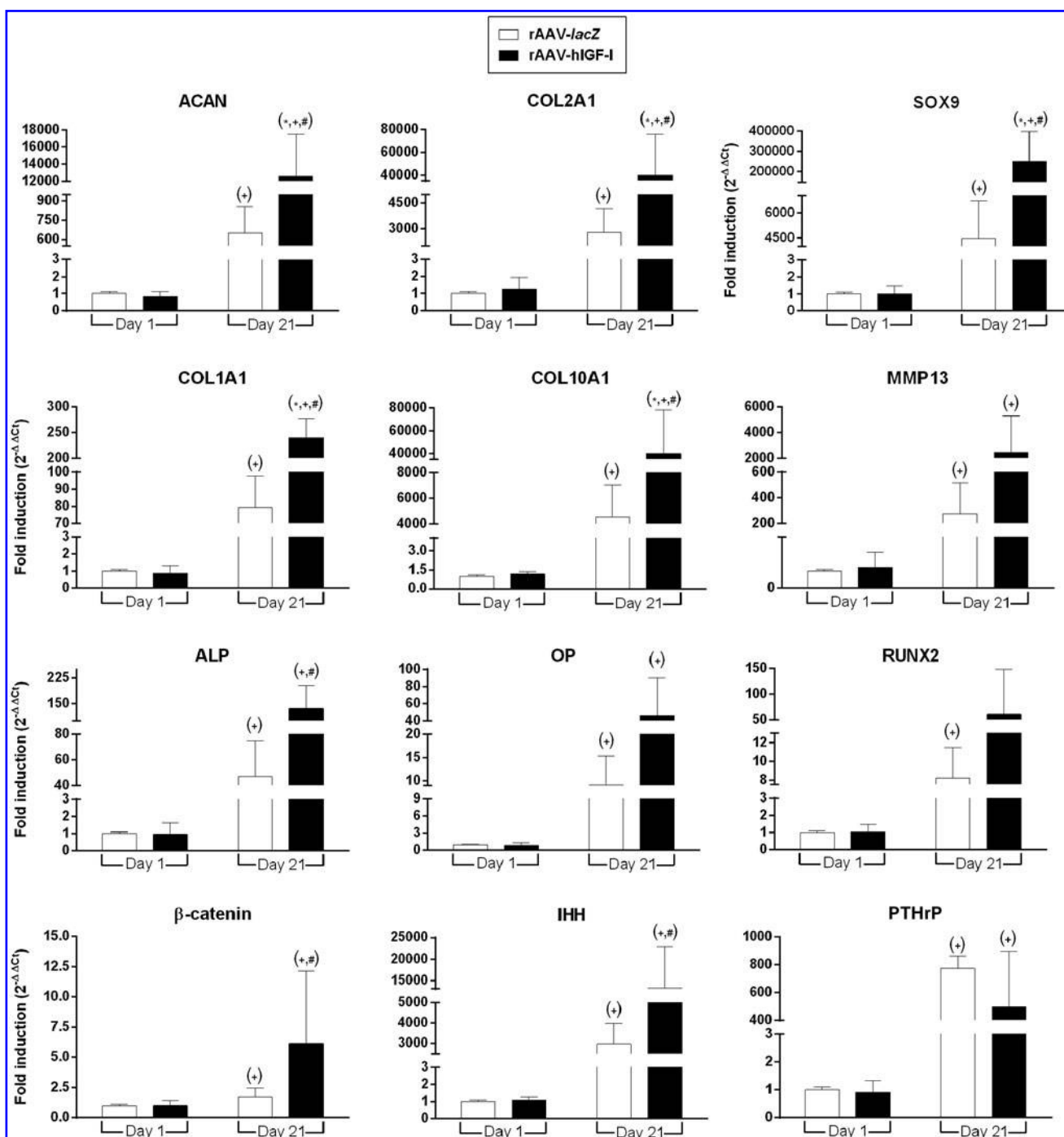
*Hypertrophic and terminal differentiation processes in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I*

Bone marrow aspirates were next transduced in chondrogenic conditions to examine the possible effects of IGF-I overexpression through rAAV upon hypertrophic and ter-

минаl differentiation processes compared with control (*lacZ*) treatment. Notably, application of rAAV-hIGF-I significantly increased the homogeneous intensities of type-I and type-X collagen immunostaining (Fig. 4A, B, respectively) and of Alizarin red staining (Fig. 4C) compared with rAAV-*lacZ* ( $685.6 \pm 95.2$  vs.  $542.1 \pm 66.1$ ,  $655.0 \pm 82.9$  vs.  $523.8 \pm 37.3$ , and  $922.0 \pm 236.4$  vs.  $715.2 \pm 337.5$  mean intensity/mm<sup>2</sup> total cell area on day 21 for type-I and type-X collagen immunostaining and for Alizarin red staining, respectively, i.e., up to a 1.3-fold difference,  $p \leq 0.043$ ). These findings were confirmed by an estimation of the type-I and type-X collagen contents in the aspirates (2.1-fold difference for type-I collagen,  $p = 0.039$ ; 1.4-fold difference for type-X collagen,  $p = 0.197$ ) (Fig. 4A, B) and by the results of a real-time RT-PCR analysis showing 3.0-fold ( $p = 0.003$ ) and 8.8-fold ( $p = 0.006$ ) higher COL1A1 and COL10A1 levels, respectively, in the IGF-I- versus *lacZ*-treated aspirates after 21 days of chondrogenic induction (Fig. 5). An evaluation of the outcomes at day 21 versus day 1 per vector type revealed over time increases in the expression of these markers in both types of aspirates (COL1A1: 79- and 271-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 3.4-fold more with IGF-I,



**FIG. 4.** Hypertrophic and terminal differentiation processes in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I. Aspirates were transduced and maintained in chondrogenic medium as described in Figure 1 and histologically processed after 21 days to monitor the levels and production of type-I (A) and type-X collagen, (B) (immunodetection and estimation of the contents), and (C) of matrix mineralization (Alizarin red staining) (magnification  $\times 40$ , insets left at magnification  $\times 20$ , insets right at magnification  $\times 100$ , representative data). \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*. Color images available online at [www.liebertpub.com/tea](http://www.liebertpub.com/tea)



**FIG. 5.** Expression analyses through real-time RT-PCR in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I. All aspirates were transduced and maintained in chondrogenic medium as described in Figure 1. Total cellular RNA extraction and cDNA synthesis with subsequent analysis of gene expression through real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification was performed as described in the Materials and Methods section after 1 and 21 days to generate time course Ct values for each target. The transcription factor SOX9, type-II collagen (COL2A1), aggrecan (ACAN), type-I collagen (COL1A1), type-X collagen (COL10A1), matrix metalloproteinase 13 (MMP13), ALP, osteopontin (OP), the transcription factor RUNX2, β-catenin, Indian-hedgehog (IHH), and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) were analyzed, with GAPDH serving as a housekeeping gene and internal control for normalization (primers are listed in the Materials and Methods section). Fold inductions were measured for each target at both time points by using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method relative to day 1 rAAV-lacZ-treated aspirates. Statistically significant compared with rAAV-lacZ at \*corresponding or +earlier time point and with #rAAV-hIGF-I at earlier time point.

$p \leq 0.001$ ; COL10A1: 4533- and 34,055-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 7.5-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.014$ ) (Fig. 5). Finally, treatment with IGF-I for 21 days enhanced the levels of these markers in the aspirates compared with samples treated with *lacZ* for 1 day (240- and 40,017-fold for COL1A1 and COL10A1, respectively,  $p \leq 0.001$ ) (Fig. 5).

Trends toward increases in the expression of MMP13 (8.9-fold,  $p = 0.225$ ), ALP (2.9-fold,  $p = 0.126$ ), OP (5.1-fold,  $p = 0.065$ ), RUNX2 (7.4-fold,  $p = 0.100$ ),  $\beta$ -catenin (3.6-fold,  $p = 0.222$ ), and IHH (4.4-fold,  $p = 0.202$ ) were noted when IGF-I was applied for 21 days to the aspirates under chondrogenic induction relative to *lacZ* at a similar time point (Fig. 5). An evaluation of the outcomes at day 21 versus day 1 per vector type revealed over time increases in the expression of these markers in both types of aspirates (MMP13: 276- and 2016-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 7.3-fold more with IGF-I,  $p = 0.007$  and  $p = 0.060$ ; ALP: 47- and 142-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., three-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.005$ ; OP: 9- and 50-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 5.6-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.014$  and  $p = 0.072$ ; RUNX2: 8- and 59-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 7.4-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.001$  and  $p = 0.212$ ;  $\beta$ -catenin: 2- and 6-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 3-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.037$ ; IHH: 2982- and 11,881-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 4-fold more with IGF-I,  $p \leq 0.017$ ) (Fig. 5). Finally, treatment with IGF-I for 21 days enhanced the expression levels of these markers in the aspirates compared with samples treated with *lacZ* for 1 day (2453-, 135-, 46-, 6-, and 13,207-fold for MMP13, ALP, OP,  $\beta$ -catenin, and IHH, respectively,  $p \leq 0.021$ ) (Fig. 5). Of further note, a trend towards decrease in the PTHrP expression was observed in the aspirates treated under chondrogenic induction with IGF-I for 21 days relative to *lacZ* at a similar time point (1.5-fold,  $p = 0.137$ ) (Fig. 5). An over time increase in the PTHrP expression was seen in both types of aspirates at day 21 versus day 1 when comparing

similar vector condition (772- and 550-fold with *lacZ* and IGF-I, respectively, i.e., 1.4-fold more with *lacZ*,  $p \leq 0.001$  and  $p = 0.082$ ) and treatment with IGF-I for 21 days enhanced the levels of this marker compared with samples modified by *lacZ* for 1 day (499-fold,  $p = 0.007$ ) (Fig. 5).

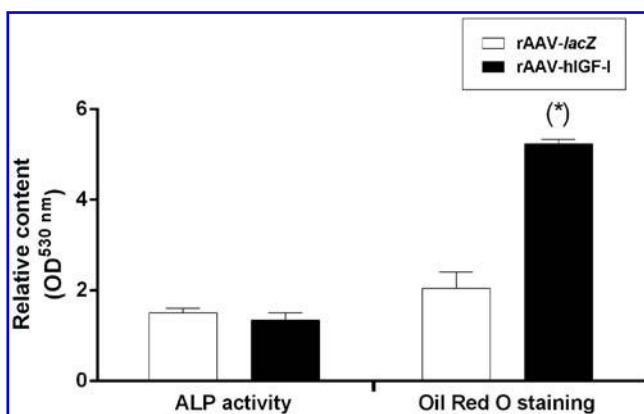
#### Effects of rAAV-hIGF-I on the osteogenic and adipogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates

Finally, bone marrow aspirates were transduced in either osteogenic or adipogenic conditions to evaluate possible effects of IGF-I overexpression through rAAV upon these differentiation processes compared with control (*lacZ*) treatment. In the conditions applied here, administration of the rAAV IGF-I vector did not significantly modify the ALP activities in the aspirates compared with the *lacZ* condition ( $p = 1.000$ ), possibly due to differences of sensitivity of the detection methods with the real-time RT-PCR analysis, while overexpression of the candidate factor significantly increased the levels of Oil Red O staining (2.6-fold,  $p = 0.019$ ) (Fig. 6).

#### Discussion

Application of marrow concentrates as a practical, single-step approach to treat articular cartilage lesions is clinical reality to provide options that are less complex and invasive than those based on the implantation of isolated progenitor cells,<sup>10,11,43</sup> but the quality of the repair tissue generated with such treatments still remains inferior to that of the original hyaline cartilage. This issue might be addressed by genetically modifying the concentrates to improve their chondroregenerative capabilities.<sup>5</sup> In the present study, we focused on delivering a sequence coding for the mitogenic and proanabolic IGF-I factor through potent and clinically adapted rAAV vectors to human marrow concentrates with respect to our previous findings showing that this construct was capable of enhancing the proliferative, biosynthetic, and chondrogenic activities of isolated human MSCs *in vitro*.<sup>20</sup>

Our results first demonstrate that high levels of cells expressing the IGF-I transgene were achieved in marrow aspirates (~80%), concordant with findings based on the previous use of reporter (*lacZ*) rAAV vectors.<sup>36</sup> For comparison, other groups<sup>34,35</sup> reported that administration of adenoviral vectors to rabbit and sheep aspirates led to the modification of an important number of cells, but using much higher vector doses ( $10^{10}$  adenoviral particles per 250  $\mu$ L of aspirate versus  $8 \times 10^5$  rAAV particles per 100  $\mu$ L here, i.e., a 5,000-fold difference). We next show that application of rAAV-hIGF-I significantly increased the levels of IGF-I production in the concentrates compared with control (*lacZ*) treatment over the whole period of evaluation (21 days), in good agreement with our previous results when applying this vector to isolated hMSCs.<sup>20</sup> Also of note, the levels of IGF-I produced in the aspirates upon rAAV-hIGF-I gene transfer were in the range of those reached in isolated hMSCs using the same construct (up to  $105.9 \pm 35.1$  pg rhIGF-I/mg total proteins in the aspirates, i.e.,  $1.3 \pm 0.5$  ng/mL at an MOI =  $10 \pm 3$  compared with up to  $2.9 \pm 0.4$  ng/mL in cells with an MOI = 20).<sup>20</sup> While early on all cell types present in the aspirates (MSCs, hematopoietic cells, fibroblasts) may be subjected to rAAV-mediated gene transfer, at extended periods of time under continuous chondrogenic



**FIG. 6.** Osteogenic and adipogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates transduced with rAAV-hIGF-I. Aspirates were transduced with rAAV-hIGF-I or rAAV-lacZ (40  $\mu$ L each vector), kept in either osteogenic or adipogenic medium, and processed after 21 days to quantitatively estimate the alkaline phosphatase (ALP) activities (osteogenesis) and Oil Red O staining (adipogenesis) in the samples, respectively, by spectrophotometry ( $OD_{530nm}$ ) as described in the Materials and Methods section.



stimulation, only MSCs capable of competently committing toward the chondrocyte phenotype in such an environment<sup>13–15</sup> might become the prevalent source of therapeutic factor overexpression. Still, the other cells in the aspirates may remain viable over the time of culture and influence the biological outcomes.

The present data further indicate that IGF-I overexpression through rAAV significantly enhanced the proliferative, biosynthetic, and chondrogenic activities in the aspirates over time, compared with control treatment, and at late versus early time points, possibly due to the sustained levels of growth factor achieved with this class of persistent vector<sup>44</sup> and consistent with the properties of IGF-I<sup>39,45</sup> and with our previous work in isolated hMSCs.<sup>20</sup> The levels of proliferation achieved here in the aspirates upon rAAV-hIGF-I gene transfer were higher than those reached in isolated hMSCs using the same construct ( $\sim 2.5 \mu\text{g}$  DNA/mg total proteins versus  $\sim 9 \text{ ng/mg}$  total proteins, respectively, i.e., a 271-fold difference),<sup>20</sup> probably due to the presence of other mitogenic factors in the aspirates and/or to possible paracrine effects of other marrow cell types modified early on by rAAV in the aspirates as reported using different experimental conditions in adherent cell cultures,<sup>46</sup> while later on, under continuous chondrogenic activation mostly the chondrogenically induced, rAAV-transduced MSCs may contribute to this process. Interestingly, even though the biosynthetic and chondrogenic activities were stimulated in the IGF-I- versus *lacZ*-treated aspirates, the levels of matrix synthesis activated by overexpression of IGF-I were inferior to those observed using isolated hMSCs ( $\sim 40 \mu\text{g}$  proteoglycans/mg total proteins versus  $\sim 284 \mu\text{g/mg}$  total proteins, respectively, and  $\sim 350 \text{ pg}$  type-II collagen/mg total proteins versus  $\sim 13 \mu\text{g/mg}$  total proteins, respectively, i.e., 7- to  $3.7 \times 10^4$ -fold difference).<sup>20</sup> These observations may reflect a lower state of activation of chondroprogenitor cells in the aspirates compared with that acquired upon expansion in culture, potential adverse effects played by other residual cells still present in the aspirate over the time of culture, or to prevalent mitogenic versus anabolic effects of IGF-I in the aspirates as seen in articular chondrocytes<sup>39</sup> (as supported by the findings on the type-II collagen contents showing only trend towards changes). Also, the outcomes may be the result of a particular timing of matrix synthesis in marrow aspirates, with production of a matrix at 21 day (a time point selected based on previous work for approaches aiming at cartilage repair<sup>34,35</sup> and as previously reported<sup>39</sup>) that may be fully deposited later on (between 40 and 50 days).<sup>47,48</sup>

We finally show that modification of the concentrates by rAAV-hIGF-I transduction led to increases in the expression of hypertrophic and osteogenic markers, an effect possibly associated with enhanced levels of MMP13 (marker of terminal differentiation), ALP and OP (osteogenic markers), RUNX2 (transcription factor controlling the osteoblastic expression of COL1, COL10, and MMP13),  $\beta$ -catenin (mediator of the Wnt pathway for osteogenic differentiation), and IHH (hypertrophy-associated marker), and to the decrease in PTHrP expression (antihypertrophic factor) mediated by the overexpression of IGF-I, although only trends were generally noted, again possibly due to a matter of timing (partial effects at day 21 vs. possible completion by days 40–50),<sup>47,48</sup> but nevertheless concordant with the previous findings<sup>49</sup> and with our observations in isolated

hMSCs.<sup>20</sup> Similarly, production of IGF-I promoted a significant activation of adipogenic differentiation in the aspirates, also in good agreement with previous work from other groups and with our findings in isolated hMSCs.<sup>20,50</sup>

In conclusion, the results of the present study validate the concept of applying rAAV vectors to human bone marrow concentrates as a means to stimulate the chondrogenic differentiation processes and offer convenient, effective tools for cartilage repair upon IGF-I overexpression, provided that a precise regulation of the levels of IGF-I produced by such modification is afforded before reimplantation in cartilage lesions to prevent premature terminal differentiation and ossification *in vivo*.<sup>34,35,51–53</sup> This might be achieved by using tissue-specific or regulatable promoters or by coadministering vectors coding for factors that are known to prevent or delay such undesirable effects (FGF-2; SOX5/SOX6/SOX9 transcription factors; PTHrP; siRNA, shRNA, or miRNA sequences targeting *coll* or *Runx2/Cbfa-1*).<sup>19,22–25,32,36,54,55</sup> Again, rAAV might be the best-suited gene vehicles to provide combinations of vectors and genes in marrow concentrates as no interference in transduction and transgene expression has been reported so far when delivering separate constructs from this class of vector.<sup>56,57</sup> Future work will be needed to adjust the timing of matrix deposition to achieve full chondrogenesis in the aspirates, for instance by performing longer time course evaluations. Such an approach might also provide insights into a possible influence of residual, other cell types upon the biological outcomes in the aspirate cultures over time. In addition, directing the initially quiescent MSCs within the aspirates to form a functional cartilaginous tissue will be necessary, an issue that might be again addressed by using MSC-specific promoters (SOX9 or type-II collagen regulatory elements instead of the CMV-IE promoter). An alternative option would be to induce first the aspirates under chondrogenic conditions, and next provide the candidate vectors. Equally important, work is ongoing to thoroughly characterize the cell subpopulations expressing the rAAV transgenes in the aspirates<sup>58</sup> and explore the prevalence of the specific effects mediated by the genetically modified MSCs over all other marrow cell types,<sup>13–15,58</sup> and to address the cell heterogeneity of the aspirates (like by using cell-specific promoters in the vectors to specifically target chondroprogenitor cells). The potential benefits of the present approach are also under investigation *in vivo* using clinically relevant models of orthotopic focal cartilage defect that provide a natural joint microenvironment for innate chondrogenesis.<sup>34,35,51–53</sup> compared with less-suited ectopic models (subcutaneous transplantation in SCID mouse lacking all joint tissues participating in the repair processes) as a means to corroborate the present findings in human marrow aspirates. The possible use of such a procedure for cartilage repair *in vivo* is supported by findings showing the formation of cartilage-like tissue in focal lesions following implantation of aspirates modified through adenoviral gene transfer.<sup>34,35</sup> Overall, our findings show the feasibility of directly modifying marrow concentrates through rAAV as a potential approach to improve articular cartilage repair.

## Acknowledgments

This research was funded by grants from the German Osteoarthritis Foundation (*Deutsche Arthrose-Hilfe e.V.*)

and the Collaborative Research Partner Acute Cartilage Injury Program of AO Foundation (Davos, Switzerland). The authors thank R.J. Samulski (The Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC), X. Xiao (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA), and E.F. Terwilliger (Division of Experimental Medicine, Harvard Institutes of Medicine and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) for providing genomic AAV-2 plasmid clones and the 293 cell line, and A.J. D'Ercole and B. Moats-Staats (Department of Pediatrics, University of North Carolina, Chapel Hill) for the human IGF-I cDNA.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Buckwalter, J.A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* **28**, 192, 1998.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**, 889, 1994.
- Horas, U., Pelinkovic, D., Herr, G., Aigner, T., and Schnettler, R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* **85-A**, 185, 2003.
- Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T.C., Drogset, J.O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V., and Johansen, O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* **86-A**, 455, 2004.
- Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J.K., Madry, H., and Cucchiari, M. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning* **7**, 1, 2014.
- Dewan, A.K., Gibson, M.A., Elisseeff, J.H., and Trice, M.E. Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed Res Int* **2014**, 272481, 2014.
- Tibesku, C.O., Szuwart, T., Kleffner, T.O., Schlegel, P.M., Jahn, U.R., Van Aken, H., and Fuchs, S. Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res* **22**, 1210, 2004.
- Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentis, J., Sanchez, A., and Garcia-Sancho, J. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* **95**, 1535, 2013.
- Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., and Horibe, S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* **13**, 595, 2004.
- Gigante, A., Cecconi, S., Calcagno, S., Busilacchi, A., and Enea, D. Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech* **1**, e175, 2012.
- Kim, J.D., Lee, G.W., Jung, G.H., Kim, C.K., Kim, T., Park, J.H., Cha, S.S., and You, Y.B. Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol* **24**, 1505, 2014.
- Slynarski, K., Deszczynski, J., and Karpinski, J. Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplant Proc* **38**, 318, 2006.
- Anam, K., and Davis, T.A. Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations. *Stem Cell Res Ther* **4**, 112, 2013.
- Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Arm, D.M., Baber, M.A., and Caplan, A.I. Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn* **219**, 50, 2000.
- Shapiro, F., Koide, S., and Glimcher, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **75**, 532, 1993.
- Frisch, J., Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Madry, H., and Cucchiari, M. Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther* **10**, 121, 2015.
- Babister, J.C., Tare, R.S., Green, D.W., Inglis, S., Mann, S., and Oreffo, R.O. Genetic manipulation of human mesenchymal progenitors to promote chondrogenesis using "bead-in-bead" polysaccharide capsules. *Biomaterials* **29**, 58, 2008.
- Bocker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D., and Schieker, M. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med* **12**, 1347, 2008.
- Cucchiari, M., Ekici, M., Schetting, S., Kohn, D., and Madry, H. Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* **17**, 1921, 2011.
- Frisch, J., Venkatesan, J.K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Madry, H., and Cucchiari, M. Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **5**, 103, 2014.
- Haleem-Smith, H., Calderon, R., Song, Y., Tuan, R.S., and Chen, F.H. Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **113**, 1245, 2012.
- Huang, J., Zhao, L., Xing, L., and Chen, D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* **28**, 357, 2010.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U.I. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 3561, 2004.
- Jeon, S.Y., Park, J.S., Yang, H.N., Woo, D.G., and Park, K.H. Co-delivery of SOX9 genes and anti-Cbfa-1 siRNA coated onto PLGA nanoparticles for chondrogenesis of human MSCs. *Biomaterials* **33**, 4413, 2012.
- Kim, H.J., and Im, G.I. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **20**, 2103, 2011.
- Kim, J.H., Park, J.S., Yang, H.N., Woo, D.G., Jeon, S.Y., Do, H.J., Lim, H.Y., Kim, J.M., and Park, K.H. The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis. *Biomaterials* **32**, 268, 2011.

27. Liu, T.M., Guo, X.M., Tan, H.S., Hui, J.H., Lim, B., and Lee, E.H. Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* **63**, 2711, 2011.
28. Liu, T.M., Ng, W.M., Tan, H.S., Vinitha, D., Yang, Z., Fan, J.B., Zou, Y., Hui, J.H., Lee, E.H., and Lim, B. Molecular basis of immortalization of human mesenchymal stem cells by combination of p53 knockdown and human telomerase reverse transcriptase overexpression. *Stem Cells Dev* **22**, 268, 2013.
29. Neumann, A.J., Alini, M., Archer, C.W., and Stoddart, M.J. Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A* **19**, 1285, 2013.
30. Pagnotto, M.R., Wang, Z., Karpie, J.C., Ferretti, M., Xiao, X., and Chu, C.R. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther* **14**, 804, 2007.
31. Steinert, A.F., Weissenberger, M., Kunz, M., Gilbert, F., Ghivizzani, S.C., Gobel, S., Jakob, F., Noth, U., and Rudert, M. Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* **14**, R168, 2012.
32. Venkatesan, J.K., Ekici, M., Madry, H., Schmitt, G., Kohn, D., and Cucchiari, M. SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* **3**, 22, 2012.
33. Yang, H.N., Park, J.S., Woo, D.G., Jeon, S.Y., Do, H.J., Lim, H.Y., Kim, S.W., Kim, J.H., and Park, K.H. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes. *Biomaterials* **32**, 7695, 2011.
34. Pascher, A., Palmer, G.D., Steinert, A., Oligino, T., Gouze, E., Gouze, J.N., Betz, O., Spector, M., Robbins, P.D., Evans, C.H., and Ghivizzani, S.C. Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther* **11**, 133, 2004.
35. Ivkovic, A., Pascher, A., Hudetz, D., Maticic, D., Jelic, M., Dickinson, S., Loparic, M., Haspl, M., Windhager, R., and Pecina, M. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther* **17**, 779, 2010.
36. Rey-Rico, A., Frisch, J., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Madry, H., and Cucchiari, M. Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther* **22**, 50, 2015.
37. Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* **61**, 3096, 1987.
38. Samulski, R.J., Chang, L.S., and Shenk, T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* **63**, 3822, 1989.
39. Weimer, A., Madry, H., Venkatesan, J.K., Schmitt, G., Frisch, J., Wezel, A., Jung, J., Kohn, D., Terwilliger, E.F., Trippel, S.B., and Cucchiari, M. Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulinlike growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med* **18**, 346, 2012.
40. Baker, N., Zhang, G., You, Y., and Tuan, R.S. Caveolin-1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **113**, 3773, 2012.
41. Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* **25**, 1384, 2007.
42. Martella, E., Bellotti, C., Dozza, B., Perrone, S., Donati, D., and Lucarelli, E. Secreted adiponectin as a marker to evaluate in vitro the adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **16**, 1476, 2014.
43. Gorski, A., Kniotek, M., Perkowska-Ptasinska, A., Mroz, A., Przerwa, A., Gorczyca, W., Dabrowska, K., Weber-Dabrowska, B., and Nowaczyk, M. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant Proc* **38**, 331, 2006.
44. Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* **70**, 8098, 1996.
45. Osborn, K.D., Trippel, S.B., and Mankin, H.J. Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res* **7**, 35, 1989.
46. Ahmed, N., Vogel, B., Rohde, E., Strunk, D., Grifka, J., Schulz, M.B., and Grassel, S. CD45-positive cells of haematopoietic origin enhance chondrogenic marker gene expression in rat marrow stromal cells. *Int J Mol Med* **18**, 233, 2006.
47. Cavallo, C., Desando, G., Columbaro, M., Ferrari, A., Zini, N., Facchini, A., and Grigolo, B. Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hyaluronan scaffold: rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J Biomed Mater Res A* **101**, 1559, 2013.
48. Grigolo, B., Cavallo, C., Desando, G., Manferdini, C., Liguori, G., Ferrari, A., Zini, N., and Facchini, A. Novel nano-composite biomimetic biomaterial allows chondrogenic and osteogenic differentiation of bone marrow concentrate derived cells. *J Mater Sci Mater Med* **26**, 173, 2015.
49. Koch, H., Jadowiec, J.A., and Campbell, P.G. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **14**, 621, 2005.
50. Scavo, L.M., Karas, M., Murray, M., and Leroith, D. Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3543, 2004.
51. Cucchiari, M., and Madry, H. Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects in vivo. *Gene Ther* **21**, 811, 2014.
52. Cucchiari, M., Madry, H., Ma, C., Thurn, T., Zurakowski, D., Menger, M.D., Kohn, D., Trippel, S.B., and Terwilliger, E.F. Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther* **12**, 229, 2005.
53. Cucchiari, M., Orth, P., and Madry, H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy in vivo. *J Mol Med (Berl)* **91**, 625, 2013.
54. Fischer, J., Aulmann, A., Dexheimer, V., Grossner, T., and Richter, W. Intermittent PTHrP(1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Dev* **23**, 2513, 2014.

55. Zhang, F., Yao, Y., Zhou, R., Su, K., Citra, F., and Wang, D.A. Optimal construction and delivery of dual-functioning lentiviral vectors for type I collagen-suppressed chondrogenesis in synovium-derived mesenchymal stem cells. *Pharm Res* **28**, 1338, 2011.
56. Cucchiari, M., Terwilliger, E.F., Kohn, D., and Madry, H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med* **13**, 2476, 2009.
57. Rendahl, K.G., Leff, S.E., Otten, G.R., Spratt, S.K., Bohl, D., Van Roey, M., Donahue, B.A., Cohen, L.K., Mandel, R.J., Danos, O., and Snyder, R.O. Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol* **16**, 757, 1998.
58. Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* **46**, 3349, 2002.

Address correspondence to:

*Magali Cucchiari, PhD*

*Center of Experimental Orthopaedics*

*Saarland University Medical Center*

*Kirrbergerstr. Bldg 37*

*D-66421 Homburg/Saar*

*Germany*

*E-mail: mmcucchiari@hotmail.com*

*Received: December 9, 2014*

*Accepted: June 26, 2015*

*Online Publication Date: July 21, 2015*

**This article has been cited by:**

1. Ana Rey-Rico, Magali Cucchiari. 2016. Recent tissue engineering-based advances for effective rAAV-mediated gene transfer in the musculoskeletal system. *Bioengineered* 00-00. [[CrossRef](#)]
2. Henning Madry, Magali Cucchiari. 2016. Gene therapy for human osteoarthritis: principles and clinical translation. *Expert Opinion on Biological Therapy* **16**, 331-346. [[CrossRef](#)]
3. Janina Frisch, Ana Rey-Rico, Jagadeesh Kumar Venkatesan, Gertrud Schmitt, Henning Madry, Magali Cucchiari. 2016. TGF- $\beta$  gene transfer and overexpression via rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **20**:10.1111/jcmm.2016.20.issue-3, 430-440. [[CrossRef](#)]



# TGF- $\beta$ gene transfer and overexpression *via* rAAV vectors stimulates chondrogenic events in human bone marrow aspirates

Janina Frisch<sup>a</sup>, Ana Rey-Rico<sup>a</sup>, Jagadeesh Kumar Venkatesan<sup>a</sup>, Gertrud Schmitt<sup>a</sup>,  
Henning Madry<sup>a, b</sup>, Magali Cucchiari<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University Medical Center, Homburg/Saar, Germany

<sup>b</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Saarland University Medical Center, Homburg/Saar, Germany

Received: September 21, 2015; Accepted: December 1, 2015

## Abstract

Genetic modification of marrow concentrates may provide convenient approaches to enhance the chondrogenic differentiation processes and improve the repair capacities in sites of cartilage defects following administration in the lesions. Here, we provided clinically adapted recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors to human bone marrow aspirates to promote the expression of the potent transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) as a means to regulate the biological and chondrogenic activities in the samples *in vitro*. Successful TGF- $\beta$  gene transfer and expression *via* rAAV was reached relative to control (*lacZ*) treatment (from 511.1 to 16.1 pg rhTGF- $\beta$ /mg total proteins after 21 days), allowing to durably enhance the levels of cell proliferation, matrix synthesis, and chondrogenic differentiation. Strikingly, in the conditions applied here, application of the candidate TGF- $\beta$  vector was also capable of reducing the hypertrophic and osteogenic differentiation processes in the aspirates, showing the potential benefits of using this particular vector to directly modify marrow concentrates to generate single-step, effective approaches that aim at improving articular cartilage repair *in vivo*.

**Keywords:** cartilage repair • gene therapy • bone marrow aspirates • rAAV • TGF- $\beta$

## Introduction

The adult articular cartilage has a limited ability for self-repair [1] as a result of the absence of vascularization in this highly specialized tissue. Options to provide reparative cells in sites of cartilage lesions include autologous chondrocyte implantation and marrow-stimulating techniques to recruit chondroregenerative bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) [2–4] but the outcome of such procedures do not meet the original hyaline cartilage as the repair tissue is commonly made of a fibrocartilaginous structure (type-I collagen instead of type-II collagen proteoglycans) of lesser mechanical quality and that does not integrate with the adjacent, original cartilage [5]. A promising approach might be to conveniently supply the lesions with bone marrow concentrates [6] composed of chondrogenically competent MSCs (~1%) that specifically commit towards the chondrocyte phenotype under adapted treatment conditions among other cell populations (haematopoietic progenitor cells, haematopoietic cells, fibroblasts) [7, 8] rather than using isolated progenitors that necessitate more complex steps of

preparation and expansion [6]. Yet, despite encouraging attempts to treat patients with bone marrow concentrates [9–15], restoration of the articular cartilage tissue in its full integrity has not been reported to date, showing the urgent need for novel, effective regimens.

Direct genetic modification of bone marrow aspirates to overexpress chondrogenic and/or chondroregenerative factors may offer improved tools to enhance the healing response in sites of cartilage injury upon local transplantation [16–18]. In marked contrast with the substantial information available on gene transfer to target isolated MSCs, little is known on the possibility to transduce marrow concentrates as a less invasive approach for improved cartilage repair. While various groups reported the ability of adenoviral vectors to mediate gene transfer in rabbit and sheep models [19–21], showing effective but relatively short-term transgene (transforming growth factor beta – TGF- $\beta$ , bone morphogenetic protein 2 – BMP-2, Indian hedgehog – IHH) expression levels (some days) at high ( $10^{10}$ – $10^{11}$ ) vector doses, we recently tested the potential of applying recombinant vectors derived from the human non-pathogenic adeno-associated virus (AAV) to human marrow aspirates in the light of the reduced toxicity and immunogenicity of this vector class that can be maintained over

\*Correspondence to: Magali CUCCHIARINI  
E-mail: mmcucchiari@hotmail.com

extended periods of time as stable and safe episomes [18]. Specifically, we showed that rAAV can achieve elevated (~90%) gene transfer efficiencies and durable (125 days) transgene expression at much lower ( $8 \times 10^5$ ) vector doses in the absence of adverse reactions [22], allowing for enhanced chondrogenic differentiation upon therapeutic gene delivery of the transcription factor SOX9 [22] of and insulin-like growth factor I (IGF-I) [23].

In this study, we tested the ability of the potent chondrogenic and chondroreparative TGF- $\beta$  factor [24–27] to stimulate the biological and chondrogenic activities in human marrow aspirates *via* rAAV gene transfer in the light of our previous findings showing activation of such processes when applying the same vector to isolated hMSCs [28]. Our results show that administration of rAAV promotes an effective, significant production of TGF- $\beta$ , leading to enhanced levels of proliferation, biosynthesis and chondrogenic differentiation in the aspirates while reducing hypertrophy/terminal differentiation and osteo-/adipogenic events, showing the value of applying such samples in site of cartilage damage during transplantation protocols.

## Materials and methods

### Reagents

All reagents were from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), unless otherwise identified. Recombinant TGF- $\beta$  (rTGF- $\beta$ ) was purchased at Peprotech (Hamburg, Germany) and the dimethylmethylene blue dye at Serva (Heidelberg, Germany). The anti-TGF- $\beta$  (V) and anti-SOX9 (C-20) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), the anti-type-II collagen (II-II6B3) antibody from the NIH Hybridoma Bank (University of Iowa, Ames, USA), the anti-type-I collagen (AF-5610) antibody from Acris (Hiddenhausen, Germany) and the anti-type-X collagen (COL-10) from Sigma-Aldrich. Biotinylated secondary antibodies and the ABC reagent were obtained from Vector Laboratories (Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Germany). The hTGF- $\beta$  Quantikine ELISA was from R&D Systems (Wiesbaden, Germany) and the type-II, -I and -X collagen ELISAs from Antibodies-Online (Aachen, Germany).

### Plasmids and rAAV vectors

All plasmids are based on the same parental AAV-2 genomic clone, pSSV9 [29, 30]. rAAV-*lacZ* carries the *lacZ* gene encoding the *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) and rAAV-hTGF- $\beta$  a human TGF beta 1 (hTGF- $\beta$ )

cDNA fragment (1.2 kb), both under the control of the cytomegalovirus immediate-early (CMV-IE) promoter [22, 23, 28, 31]. Conventional (not self-complementary) rAAV vectors were packaged using the 293 adenovirus-transformed embryonic kidney cell line. Helper functions were provided by Adenovirus 5 in combination with rep and cap functions of a pAd8 helper plasmid as previously described [28]. Purification, dialysis and titration of the vector preparations *via* real-time PCR were performed, averaging  $10^{10}$  transgene copies/ml with approximately 1/500 functional recombinant viral particles [22, 23, 28, 31].

### rAAV-mediated gene transfer

Bone marrow was aspirated from the distal femurs of patients undergoing total knee arthroplasty (~10 ml,  $n = 3$ ). All patients included in the study provided informed consent and the procedures were in accordance with the Helsinki Declaration. The study was approved by the Ethics Committee of the Saarland Physicians Council (Application 06/08). Aspirates were immediately aliquoted in a volume of 100  $\mu$ l per well in 96-well plates and transduced with 40  $\mu$ l vector (*i.e.*  $8 \times 10^5$  functional recombinant viral particles, MOI =  $10 \pm 3$ ) [22, 23]. Samples were incubated for up to 21 days with various differentiation medium (Table 1), with careful weekly medium change to induce chondro-, osteo-, and adipogenic differentiation [22, 23]. Under continuous chondrogenic induction, mostly MSCs in the samples will commit towards the chondrocyte phenotype [23]. As we previously noted that the use of these media does not impede the effects of gene transfer *via* rAAV on the differentiation processes *versus* basal medium in aspirates [23], uninduced conditions were not further tested here.

### Transgene expression

Transforming growth factor- $\beta$  production was monitored by ELISA at the denoted time-points by absorbance measurements on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan, Crailsheim, Germany) and by immunohistochemistry using a specific TGF- $\beta$  antibody, a biotinylated secondary antibody, and diaminobenzidine as a chromogen (ABC method) [28, 31]. A control condition with omission of the primary antibody was included to check for secondary immunoglobulins. All sections were examined under light microscopy (Olympus BX45; Olympus, Hamburg, Germany).

### Biochemical analyses

The aspirates were resuspended in a total volume of 100  $\mu$ l of fresh DMEM and digested with papain (final concentration 75  $\mu$ g/ml) at 60°C

**Table 1** Inductive media for chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation

Pathway	Medium
Chondrogenesis	4.5 g/l DMEM high glucose, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu$ l/ml streptomycin, 6.25 $\mu$ g/ml insulin, 6.25 $\mu$ g/ml transferrin, 6.25 $\mu$ g/ml selenious acid, 5.35 $\mu$ g/ml linoleic acid, 1.25 $\mu$ g/ml BSA, 1 mM sodium pyruvate, 37.5 $\mu$ g/ml ascorbate 2-phosphate, $10^{-7}$ M dexamethasone and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3
Osteogenesis	StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany)
Adipogenesis	StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (Life Technologies)

[23]. The DNA contents were measured by fluorimetry using Hoechst 22358 and the proteoglycan contents by binding to dimethylmethylene blue dye [23]. The type-II, -I and -X collagen contents were determined by ELISA [23]. Values were normalized to total cellular proteins monitored *via* Pierce Thermo Scientific Protein Assay (Fisher Scientific, Schwerte, Germany).

For the determination of ALP activity, osteogenically induced aspirates were mixed with an equal volume of substrate buffer (4-nitrophenyl phosphate – pNPP – mixed 1:1 with 4.8% 2-amino-2-methyl-1-propanol – 2-AMP) for measurement of OD<sup>530nm</sup> [23]. Adipogenically induced samples were resuspended in 150 µl of staining solution (three volumes of Oil Red O 0.3% in 2-propanol and two volumes H<sub>2</sub>O) and incubated for 15 min. at room temperature followed by dissolution in 100% 2-propanol and by measuring OD<sup>530nm</sup> [23]. All measurements were performed on a GENios spectrophotometer/fluorometer (Tecan).

## Histological and immunohistochemical analyses

Aspirates were collected and fixed in 4% formalin with subsequent dehydration in graded alcohols, paraffin embedding and sectioning at 3 µm. Haematoxylin and eosin staining was performed to evaluate cellularity and toluidine blue and alizarin red staining for the detection of matrix proteoglycans and matrix mineralization respectively [22, 23]. The expression of type-II, -I and -X collagen and of SOX9 was evaluated by immunohistochemistry using specific primary antibodies, biotinylated secondary antibodies and the ABC method [22, 23]. Control conditions were included by omitting the primary antibodies. All sections were examined under light microscopy (Olympus BX45; Olympus).

## Histomorphometry

Transgene expression was monitored by evaluating the percentage of TGF-β<sup>+</sup> cells to the total number of cells on immunohistochemical sections [23]. Cell proliferation was evaluated by counting the total cells per standardized area on haematoxylin and eosin-stained sections [23]. The intensities of toluidine blue and alizarin red staining and those of type-II, -I and -X collagen and SOX9 immunostaining were monitored at magnification ×20 by inverting the pictures to greyscale mode, adapting background DAB signal for comparable range and measuring the mean grey value per total area covered with cells (mm<sup>2</sup>) [23]. The data were recorded at three random standardized sites or with 10 serial histological and immunohistochemical sections for each parameter, test and replicate condition using the SIS analySIS program (Olympus) and Adobe Photoshop (Adobe Systems, Unterschleissheim, Germany) and are given as mean intensity of staining or immunostaining per mm<sup>2</sup> of total cell area [23].

## Real-time RT-PCR analyses

TRIzol reagent (Ambion® Life Technologies, Thermo Scientific, Schwerte, Germany) and RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) were used to extract total cellular RNA from all chondrogenically differentiated aspirates on day 21 post-transduction. The procedure included an on-column RNase-free DNase treatment (Qiagen) and extracted RNA was eluted in 30 µl of RNase-free water followed by reverse transcription using the 1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV; Roche

Applied Science, Mannheim, Germany) with aliquots of 8 µl RNA eluate. The resulting cDNA products (≥2 µl per sample) were finally amplified by real-time RT-PCR with Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on an Mx3000P QPCR operator system (Stratagene) under the following conditions: (95°C, 10 min.), amplification by 55 cycles (denaturation at 95°C, 30 sec.; annealing at 55°C, 1 min.; extension at 72°C, 30 sec.), denaturation (95°C, 1 min.) and final incubation (55°C, 30 sec.). Primers for selected gene profiles are listed in Table 2 and applied at a final concentration of 150 nm. Controls consisting of water and non-reverse-transcribed mRNA were included and confirmation of the product specificities was done *via* melting curve analysis and agarose gel electrophoresis as previously described [23]. The MxPro QPCR Software (Stratagene) was used for measurements of the threshold cycle (Ct) value of each gene of interest and all values were normalized to GAPDH expression using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method [23].

## Statistical analyses

Each condition was performed in duplicate in two independent experiments for each patient. Data are expressed as mean ± S.D. of separate

**Table 2** Primers used for RT-PCR

Gene	Primer sequences (5'–3')
SOX9*	ACACACAGCTCACTCGACCTTG GGGAATCTGGTTGGTCTCT
COL2A1*	GGACTTTTCTCCCTCTCT GACCCGAAGGTCTTACAGGA
ACAN*	GAGATGGAGGTTGAGGTC ACGCTGCCTCGGGCTTC
COL1A1†	ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC
COL10A1‡	CCCTCTGTAGTGCCAACC AGATCCAGTCCTTGGGTCA
MMP13‡	AATTTTCACTTTTGGAATGA CAAATAATTTATGAAAAGGGATGC
ALP†	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC
RUNX2†	GCAGTTCCCAAGCATTTTCAT CACTCTGGCTTTGGGAAGAG
GAPDH§	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC GAAGATGGTATGGGATTTTC

\*Chondrogenic markers.

†Osteogenic markers.

‡Hypertrophic and terminal differentiation markers.

§Housekeeping gene (control).

SOX9: SRY (sex determining region Y)-box 9; COL2A1: type-II collagen α1; ACAN: aggrecan; COL1A1: type-I collagen α1; COL10A1: type-X collagen α1; MMP13: matrix metallo-proteinase 13; ALP: alkaline phosphatase; RUNX2: runt-related transcription factor 2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

experiments. The *t*-test and Mann–Whitney rank-sum test were used where appropriate. Any *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Effective TGF- $\beta$ overexpression *via* rAAV in chondrogenically induced human bone marrow aspirates

Human bone marrow aspirates were first transduced with the candidate rAAV-hTGF- $\beta$  vector *versus* control (rAAV-*lacZ*) condition and cultivated for up to 21 days to test the ability of rAAV to promote the overexpression of the candidate TGF- $\beta$  factor in conditions of chondrogenic induction. Transgene expression analyses revealed significantly higher immunoreactivity to TGF- $\beta$  in the aspirates transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* ( $1553.2 \pm 147.0$  and  $1056.9 \pm 221.1$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - *versus* *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.5-fold difference,  $P = 0.002$ ) (Fig. 1). These results were supported by an estimation of the TGF- $\beta$  production levels, revealing significantly higher values on days 7 and 21 (up to 2.9-fold difference,  $P \leq 0.021$ ) (Table 3).

### Proliferative and chondrogenic effects of rAAV-mediated overexpression of TGF- $\beta$ in chondrogenically induced human bone marrow aspirates

The aspirates were next transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* and induced towards chondrogenesis to evaluate the

**Table 3** Production of TGF- $\beta$  in chondrogenically induced human bone marrow aspirates *via* rAAV-mediated gene transfer

Days post-transduction	rAAV- <i>lacZ</i>	rAAV-hTGF- $\beta$
7	178.5 (10.0)	511.1 (116.9)*
14	49.4 (7.1)	112.5 (56.3)
21	5.8 (3.1)	16.1 (5.9)*

\*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.

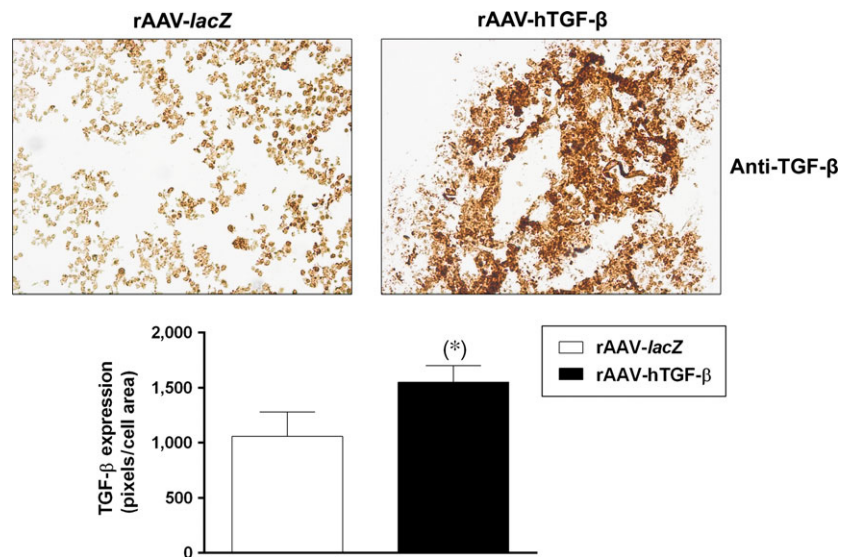
Values are expressed as means pg/24 hrs/mg total proteins (S.D.).

effects of TGF- $\beta$  overexpression upon the proliferative activities and potential for chondrogenic differentiation in the samples. As we previously reported a lack of deleterious effects of rAAV gene transfer upon the potency of bone marrow aspirates [22], we did not further include a condition without vector treatment in this study.

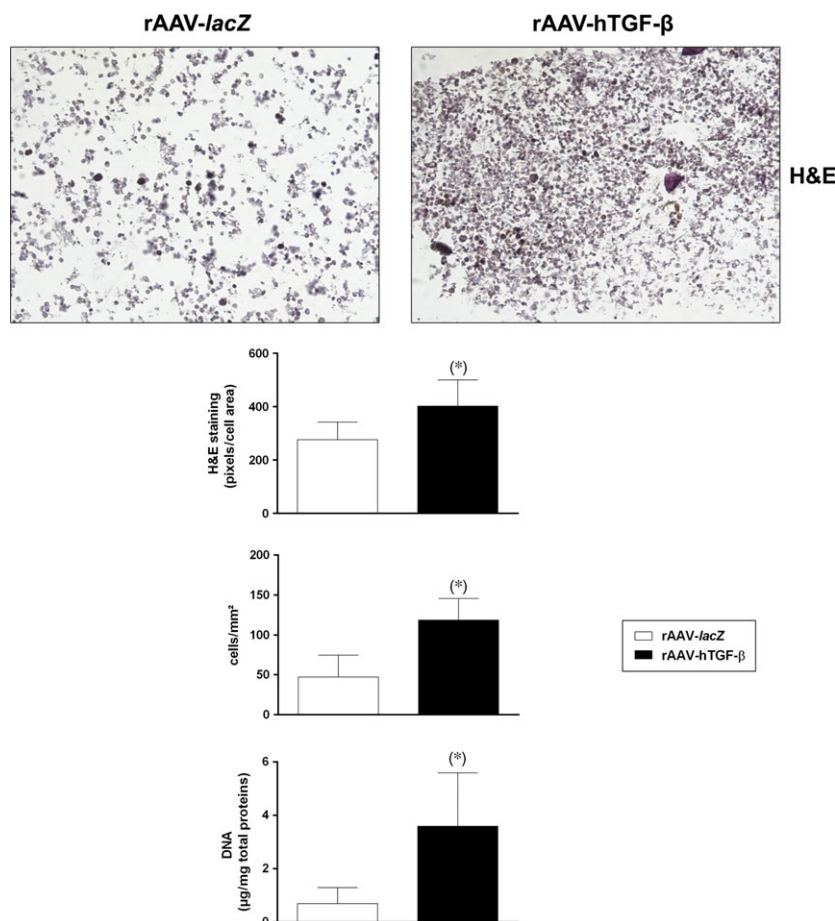
A quantitative analysis by haematoxylin and eosin staining revealed significantly higher cell densities in the presence of rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* ( $402.0 \pm 98.9$  and  $276.0 \pm 66.2$  pixels/cell area and  $118.8 \pm 27.1$  and  $47.2 \pm 27.2$  cells/mm<sup>2</sup> after 21 days in the TGF- $\beta$ - *versus* *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* an up to 2.5-fold difference, always  $P \leq 0.004$ ) (Fig. 2). These results were further confirmed *via* a biochemical assay to monitor the DNA contents in the aspirates, revealing significantly higher values with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* ( $3.6 \pm 2.0$  and  $0.7 \pm 0.6$   $\mu$ g/mg total proteins after 21 days in the TGF- $\beta$ - *versus* *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 5.1-fold difference,  $P = 0.018$ ) (Fig. 2).

To monitor the effects of TGF- $\beta$  overexpression upon the chondrogenic events in the aspirates, the samples were further processed for the cartilage-specific proteoglycans, type-II collagen, and SOX9 markers by histological and immunohistochemical analyses. Significantly increased intensities were detected in the aspirates transduced

**Fig. 1** Detection of TGF- $\beta$  overexpression *via* rAAV-mediated gene transfer in chondrogenically induced human bone marrow aspirates. The aspirates were transduced with rAAV-*lacZ* or rAAV-hTGF- $\beta$  (40  $\mu$ l each vector) and kept in chondrogenic medium (Table 1) for 21 days. The samples were processed to monitor TGF- $\beta$  production by immunohistochemical analysis (magnification  $\times 20$ ; representative data) with corresponding histomorphometric assessments and by estimating the transduction efficiencies as described in the Materials and methods. \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.







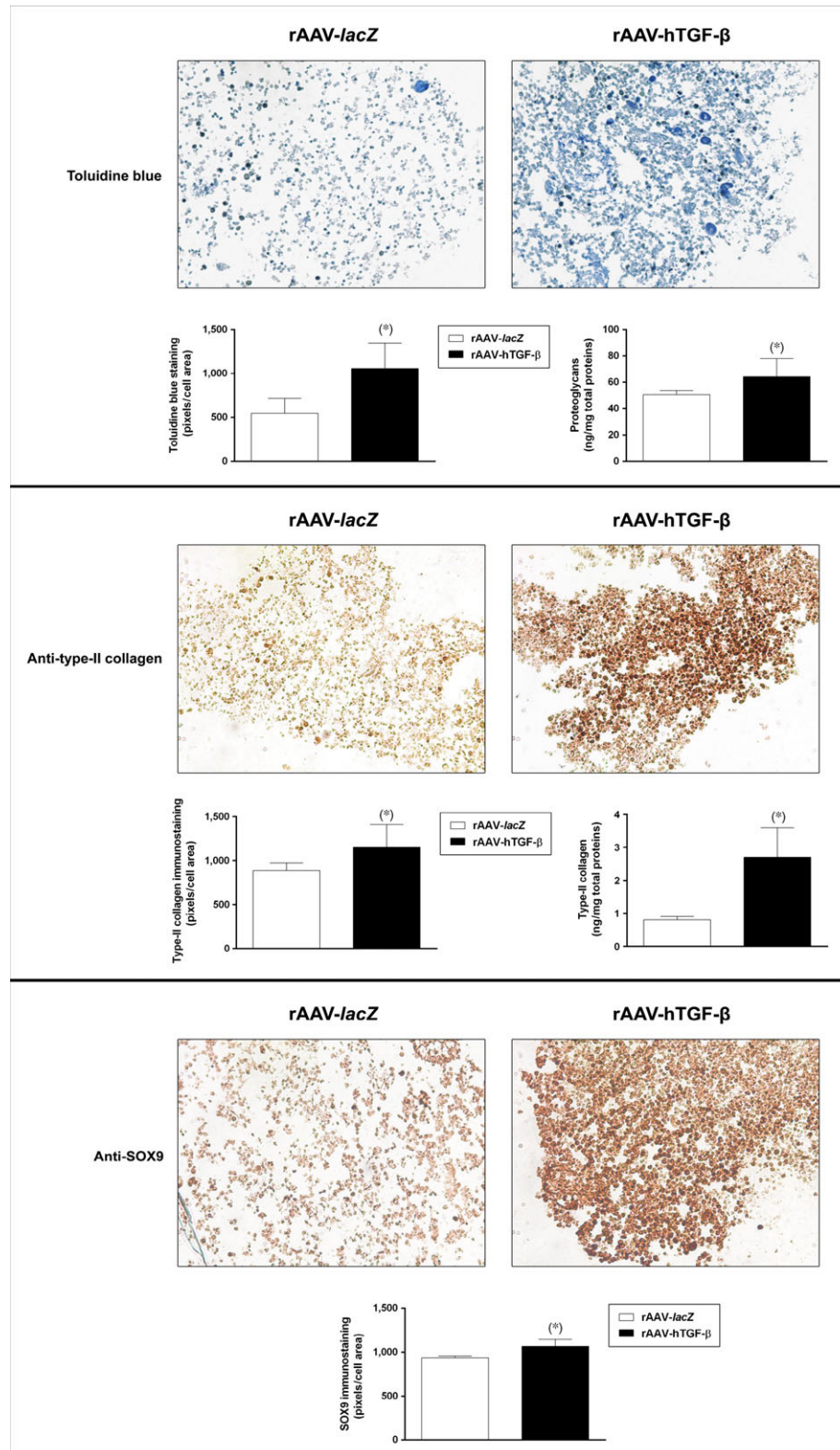
**Fig. 2** Effects of rAAV-mediated TGF- $\beta$  overexpression upon the proliferative activities in chondrogenically induced human bone marrow aspirates. The aspirates were transduced with rAAV-*lacZ* or rAAV-hTGF- $\beta$  as described in Figure 1 and kept in chondrogenic medium for 21 days. The samples were processed to evaluate the cell densities on haematoxylin and eosin-stained histological sections (magnification  $\times 20$ ; representative data) and to monitor the DNA contents by Hoechst 22358 assay as described in the Materials and methods. \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.

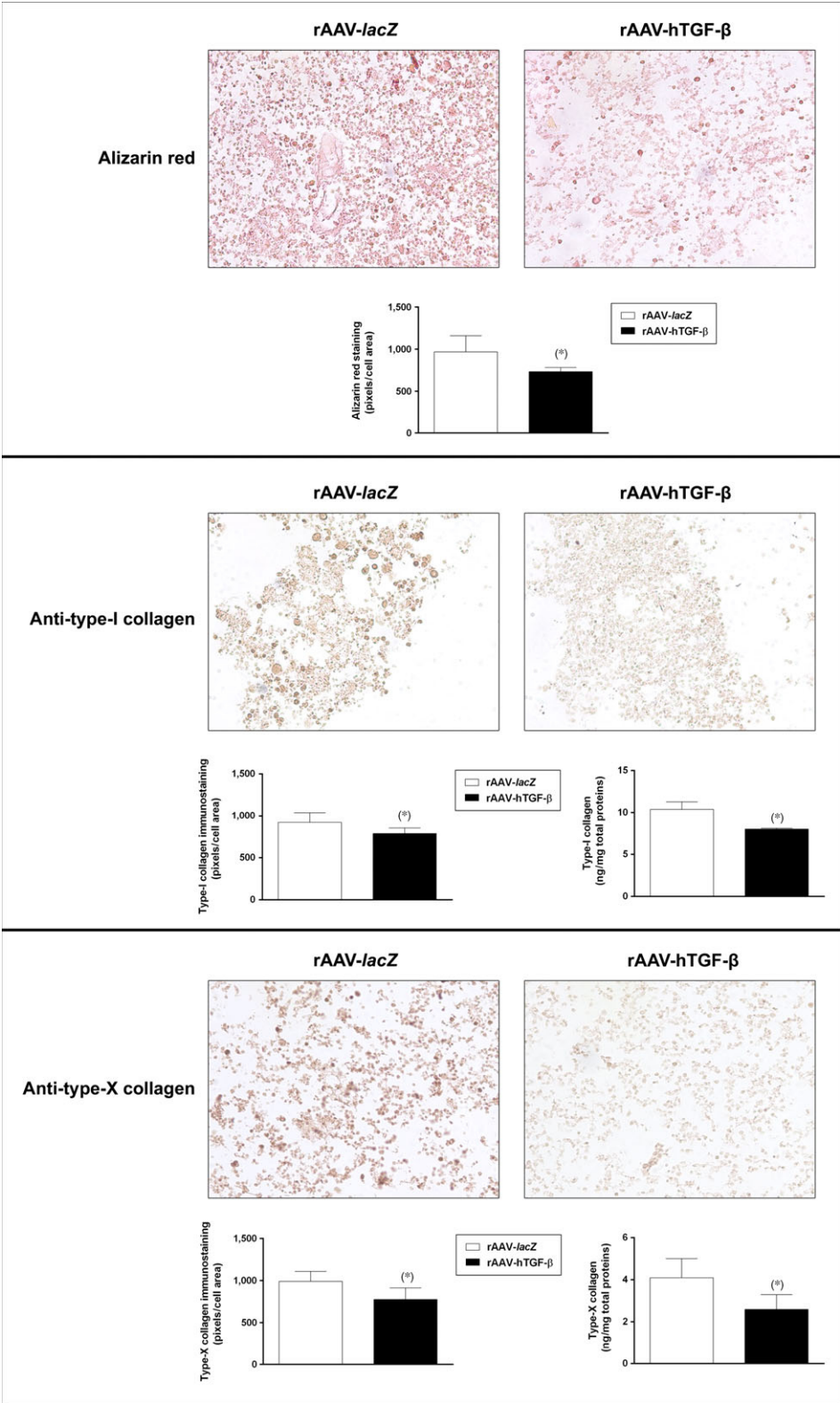
with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* for toluidine blue staining ( $1059.4 \pm 284.1$  and  $545.1 \pm 173.7$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.9-fold difference,  $P = 0.005$ ), anti-type-II collagen immunostaining ( $1151.5 \pm 260.8$  and  $888.9 \pm 85.8$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.3-fold difference,  $P = 0.037$ ), and anti-SOX9 immunostaining ( $1069.8 \pm 76.8$  and  $938.9 \pm 20.9$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.2-fold difference,  $P = 0.028$ ) (Fig. 3). A biochemical analysis of the proteoglycan and type-II collagen contents confirmed these results, showing higher values in the presence of rAAV-hTGF- $\beta$  ( $64.3 \pm 13.8$  and  $50.8 \pm 2.9$  ng proteoglycans/mg total proteins and  $2.7 \pm 0.9$  and  $0.8 \pm 0.1$  ng type-II collagen/mg total proteins after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* an up to 3.4-

fold difference, always  $P \leq 0.047$ ) (Fig. 3). In addition, an analysis of the gene expression profiles in the aspirates by real-time RT-PCR revealed increases in the expression of ACAN (1.6-fold), COL2A1 (1.4-fold), and SOX9 (6.8-fold) after 21 days in the aspirates transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* (always  $P \leq 0.028$ ) (Fig. 5).

Hypertrophic/terminal differentiation was also monitored in the aspirates to evaluate the impact of TGF- $\beta$  overexpression in the samples. An immunohistochemical analysis revealed significantly lower intensities in the aspirates transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* for alizarin red staining ( $734.9 \pm 48.0$  and  $968.7 \pm 192.6$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.3-fold difference,  $P = 0.016$ ), type-I collagen immunostaining ( $789.5 \pm 64.7$  and  $921.2 \pm 117.9$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus

**Fig. 3** Detection of cartilage-specific components in chondrogenically induced human bone marrow aspirates overexpressing TGF- $\beta$ . The aspirates were transduced with rAAV-*lacZ* or rAAV-hTGF- $\beta$  as described in the Figures 1 and 2 and kept in chondrogenic medium for 21 days. The samples were processed to monitor the deposition of proteoglycans and of type-II collagen (toluidine blue staining and immunodetection, respectively) and the expression of SOX9 (immunodetection) (all at magnification  $\times 20$ ; representative data), including histomorphometric analyses and an estimation of the proteoglycan and type-II collagen contents as described in the Materials and methods. \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.





**Fig. 4** Detection of hypertrophy and terminal differentiation in chondrogenically induced human bone marrow aspirates overexpressing TGF- $\beta$ . The aspirates were transduced with rAAV-*lacZ* or rAAV-hTGF- $\beta$  as described in the Figures 1–3 and kept in chondrogenic medium for 21 days. The samples were processed to monitor matrix mineralization (alizarin red staining) and the expression of type-I and type-X collagen (immunodetection) (all at magnification  $\times 20$ ; representative data), including histomorphometric analyses and an estimation of the type-I and -X collagen contents as described in the Materials and methods. \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.

*lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.2-fold difference,  $P = 0.043$ ), and type-X collagen immunostaining ( $777.4 \pm 136.1$  and  $992.3 \pm 116.3$  pixels/cell area after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.3-fold difference,  $P = 0.001$ ) (Fig. 4). A biochemical analysis performed to estimate the type-I and -X collagen contents supported these findings, showing lower values in the presence of rAAV-hTGF- $\beta$  ( $8.0 \pm 0.1$  and  $10.4 \pm 0.9$  ng type-I collagen/mg total proteins and  $2.6 \pm 0.7$  and  $4.1 \pm 0.9$  ng type-X collagen/mg total proteins after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, up to 1.6-fold difference, always  $P \leq 0.041$ ) (Fig. 4). Also, an analysis of the gene expression profiles in the aspirates monitored by real-time RT-PCR revealed decreases in the expression of type-I (4.3-fold) and type-X collagen (13.1-fold) after 21 days in the aspirates transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* (always  $P \leq 0.003$ ) (Fig. 5). Such profiles were accompanied by a reduced expression of markers of terminal differentiation and osteogenesis with rAAV-hTGF- $\beta$  (3.2-, 2.2-, and 3.5-fold decreased MMP13, ALP, and RUNX2 expression after 21 days, respectively), although statistical significance was not reached in the conditions applied here (always  $P \leq 0.210$ ) (Fig. 5).

### Effects of rAAV-mediated overexpression of TGF- $\beta$ in osteogenically and adipogenically induced human bone marrow aspirates

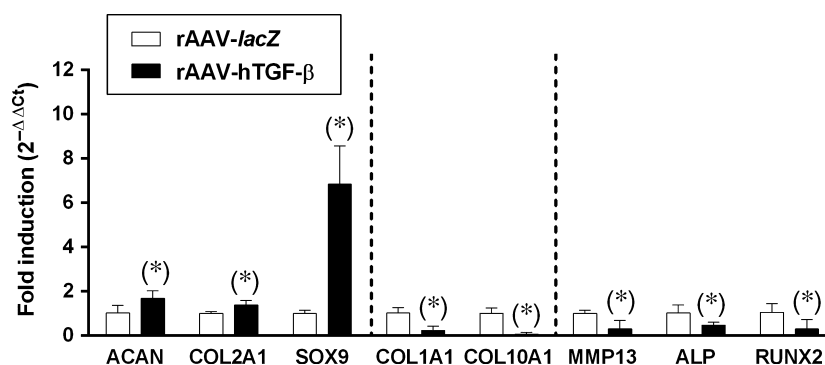
The aspirates were also transduced with rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* and induced towards osteogenesis and adipogenesis to

evaluate the influence of TGF- $\beta$  overexpression on the potential for osteo/adipogenic differentiation in the samples. While a trend towards enhanced adipogenic differentiation (Oil Red O staining) was seen in the presence of rAAV-hTGF- $\beta$  compared with rAAV-*lacZ* ( $4.13 \pm 0.36$  and  $2.04 \pm 0.37$  OD<sup>530nm</sup> after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a twofold difference), osteogenic differentiation (ALP activity) was attenuated with TGF- $\beta$  ( $0.49 \pm 0.07$  and  $0.75 \pm 0.25$  OD<sup>530nm</sup> after 21 days in the TGF- $\beta$ - versus *lacZ*-treated samples, respectively, *i.e.* a 1.5-fold difference), although statistical significance was not reached in the conditions applied here ( $P = 0.076$  and  $P = 0.234$  respectively) (Fig. 6).

## Discussion

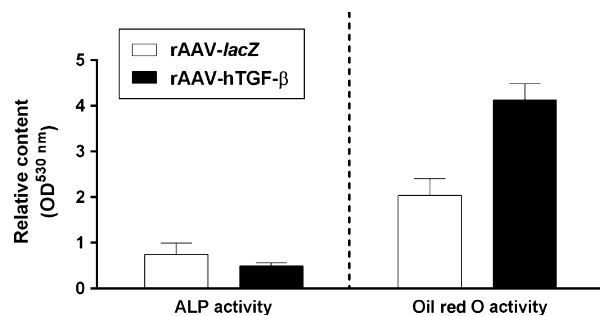
Administration of genetically modified marrow concentrates to site of cartilage lesions *via* transfer of chondrogenic and/or chondroreparative factors using the clinically adapted rAAV vectors may provide convenient, single-step therapeutic approaches to enhance cartilage repair compared with the more complex and invasive implantation of isolated progenitor cells [6]. In this study, we examined the ability of rAAV to deliver a functional TGF- $\beta$  gene cassette to human marrow concentrates in the light of the pleiotropic, chondrogenic properties of this growth factor [24–27] and with our previous findings showing that such a strategy was capable of stimulating such activities in isolated human MSCs [28].

We first observed that transduction with rAAV led to higher levels of TGF- $\beta$  expression in the hTGF- $\beta$ -treated concentrates



**Fig. 5** Gene expression analyses by real-time RT-PCR in chondrogenically induced human bone marrow aspirates overexpressing TGF- $\beta$ . The aspirates were transduced with rAAV-*lacZ* or rAAV-hTGF- $\beta$  as described in the Figures 1–4 and kept in chondrogenic medium for 21 days. The samples were processed to monitor the expression profiles of aggrecan (ACAN), type-II collagen (COL2A1), the transcription factor SOX9, type-I collagen (COL1A1), type-X collagen (COL10A1), matrix metallo-proteinase 13 (MMP13), alkaline phosphatase (ALP), and the transcription factor RUNX2, with GAPDH serving as a housekeeping gene and internal control for normalization. Ct values were generated for each target gene and fold inductions (relative to rAAV-*lacZ*-treated aspirates) were measured by using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method as described in the Materials and methods. \*Statistically significant compared with rAAV-*lacZ*.





**Fig. 6** Detection of osteogenic and adipogenic differentiation in osteogenically and adipogenically induced human bone marrow aspirates overexpressing TGF- $\beta$ . The aspirates were transduced with rAAV-lacZ or rAAV-hTGF- $\beta$  as described in the Figures 1–5 and kept either in osteogenic or adipogenic medium (Table 1) for 21 days. The samples were processed to monitor the ALP activities and evaluate Oil Red O staining, respectively, as described in Materials and methods.

compared with control (*lacZ*) treatment over the period of evaluation (21 days), in good agreement with our previous results in hMSCs [28]. The concentrations achieved *via* rAAV-hTGF- $\beta$  gene transfer over time were in the range of those noted in hMSCs (~16.1 and ~24.1 pg rhTGF- $\beta$ /mg total proteins on day 21 in the aspirates and in isolated cells respectively) [28]. Our findings further indicate that overexpression of TGF- $\beta$  *via* rAAV led to increased levels of proliferative, biosynthetic and chondrogenic activities in the aspirates over time relative to control treatment, possibly because of the prolonged production of the growth factor permitted by stable rAAV gene transfer [32] and concordant with the effects of TGF- $\beta$  when applied in a recombinant form [24–27] or used by us to target isolated hMSCs [28]. Of note, the levels of proliferation in the TGF- $\beta$ -treated aspirates were higher than those noted with hMSCs (~3.6  $\mu$ g *versus* ~26.4 ng DNA/mg total proteins, respectively, *i.e.* a 136-fold difference) [28], possibly because of the presence of other mitogenic factors in the aspirates and/or to effects from other marrow cell populations modified early on by rAAV while later on, under continuous chondrogenic activation mostly chondrogenically induced, rAAV-modified MSCs may control this process (paracrine *versus* autocrine effects). We thus anticipate that their depletion may prevent the effects of TGF- $\beta$  in conditions of permanent chondrogenic activation over the current extended period of evaluation. Still, work would be needed to confirm this hypothesis by modifying aspirates devoid of the MSC subpopulation. In contrast, the levels of matrix synthesis were lower in the aspirates compared with those observed in isolated hMSCs (~2.7 *versus* ~9.5 ng type-II collagen/mg total proteins on day 21, respectively, *i.e.* a 3.5-fold difference; ~64.3 ng *versus* ~378.5  $\mu$ g proteoglycans/mg total proteins, respectively, *i.e.* a  $5.8 \times 10^3$ -fold difference) [28], possibly because of a lower state of activation of chondroprogenitor cells in the aspirates compared with that acquired during cell expansion, to adverse effects from distinct, residual cells, and/or to prevalent mitogenic *versus* anabolic effects

of TGF- $\beta$  in aspirates as noted in chondrocytes [33]. It cannot be excluded that the levels of matrix synthesis may still increase upon TGF- $\beta$  treatment beyond the time-point selected here according to the relevant literature [19, 20, 23]. Such effects are most likely mediated by binding of TGF- $\beta$  to its receptor (T $\beta$ RII-T $\beta$ RI complex with R-Smad cascade) and work is ongoing to test this hypothesis by performing receptor blocking studies [34]. Finally, we report that in the conditions tested here, application of the candidate rAAV-hTGF- $\beta$  vector delayed hypertrophic and osteogenic differentiation in the aspirates, in association with reduced levels of MMP13 (marker of terminal differentiation), ALP (osteogenic marker) and RUNX2 (transcription factor controlling the osteoblastic expression of COL1, COL10 and MMP13). This is in striking contrast with our previous findings in isolated hMSCs, where the same vector stimulated instead these processes compared with control treatment [28]. Again, this might be the result of effects from other, beneficial factors present in the aspirates and/or of specific control pathways possibly activated in the presence of other marrow cell populations [35].

In conclusion, the results of this study show the value of providing therapeutic rAAV vectors to human bone marrow concentrates to enhance the chondrogenic differentiation processes for implantation in sites of cartilage injury. Work is ongoing to support the practicability of the approach by applying modified aspirates to focal defects [6, 19–21, 36, 37]. Also important, the cell subpopulations promoting the chondrogenic events in the aspirates are currently being characterized [7, 8, 38] to address the cell heterogeneity of the aspirates. Also, it remains to be seen whether gene transfer of TGF- $\beta$  will be sufficient to achieve full repair in the lesions, and co-application of other candidates might be necessary, like for instance the cartilage oligomeric matrix protein, BMPs, IGF-I, basic fibroblast growth factor-2, SOX transcription factors, zinc-finger protein 145 (ZNF145), Indian hedgehog (Ihh) or human telomerase (hTERT) [22, 23, 39–47]. Combined gene transfer will be possible using rAAV as transduction with this class of vectors does not lead to gene transfer interference [48]. Overall, our results show the benefits of a direct modification of marrow aspirates *via* rAAV for the future treatment of cartilage defects.

## Acknowledgements

This research was funded by grants from the German Osteoarthritis Foundation (*Deutsche Arthrose-Hilfe e.V.*). We thank R. J. Samulski (The Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC), X. Xiao (The Gene Therapy Center, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA) and E. F. Terwilliger (Division of Experimental Medicine, Harvard Institutes of Medicine and Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) for providing genomic AAV-2 plasmid clones and the 293 cell line.

## Conflicts of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

## References

- Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998; 28: 192–202.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994; 331: 889–95.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, *et al.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86-A: 455–64.
- Madry H, Grun UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int.* 2011; 108: 669–77.
- Dewan AK, Gibson MA, Elisseeff JH, *et al.* Evolution of autologous chondrocyte repair and comparison to other cartilage repair techniques. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 272481–92.
- Orth P, Rey-Rico A, Venkatesan JK, *et al.* Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning.* 2014; 7: 1–17.
- Lennon DP, Haynesworth SE, Arm DM, *et al.* Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis. *Dev Dyn.* 2000; 219: 50–62.
- Anam K, Davis TA. Comparative analysis of gene transcripts for cell signaling receptors in bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cell and mesenchymal stromal cell populations. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4: 112–24.
- Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant.* 2004; 13: 595–600.
- Slynski K, Deszczynski J, Karpinski J. Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplant Proc.* 2006; 38: 318–9.
- Gigante A, Cecconi S, Calcagno S, *et al.* Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech.* 2012; 1: e175–80.
- Enea D, Cecconi S, Calcagno S, *et al.* Single-stage cartilage repair in the knee with microfracture covered with a resorbable polymer-based matrix and autologous bone marrow concentrate. *Knee.* 2013; 20: 562–9.
- Orozco L, Munar A, Soler R, *et al.* Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation.* 2013; 95: 1535–41.
- Skowronski J, Skowronski R, Rutka M. Large cartilage lesions of the knee treated with bone marrow concentrate and collagen membrane—results. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2013; 15: 69–76.
- Kim JD, Lee GW, Jung GH, *et al.* Clinical outcome of autologous bone marrow aspirates concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2014; 24: 1505–11.
- Cucchiari M, Madry H, Guilak F, *et al.* A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater.* 2014; 27: 12–6.
- Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, *et al.* Tissue engineering for articular cartilage repair—the state of the art. *Eur Cell Mater.* 2013; 25: 248–67.
- Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, *et al.* Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015; 10: 121–31.
- Pascher A, Palmer GD, Steinert A, *et al.* Gene delivery to cartilage defects using coagulated bone marrow aspirate. *Gene Ther.* 2004; 11: 133–41.
- Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, *et al.* Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther.* 2010; 17: 779–89.
- Sieker JT, Kunz M, Weissenberger M, *et al.* Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015; 23: 433–42.
- Rey-Rico A, Frisch J, Venkatesan JK, *et al.* Determination of effective rAAV-mediated gene transfer conditions to support chondrogenic differentiation processes in human primary bone marrow aspirates. *Gene Ther.* 2015; 22: 50–7.
- Frisch J, Rey-Rico A, Venkatesan JK, *et al.* Chondrogenic differentiation processes in human bone marrow aspirates upon rAAV-mediated gene transfer and overexpression of the insulin-like growth factor I. *Tissue Eng Part A.* 2015; 21: 2460–71.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, *et al.* Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 1998; 4: 415–28.
- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, *et al.* The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80: 1745–57.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143–7.
- Barry F, Boynton RE, Liu B, *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001; 268: 189–200.
- Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, *et al.* Determination of the chondrogenic differentiation processes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells genetically modified to overexpress transforming growth factor-beta via recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther.* 2014; 25: 1050–60.
- Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised *in vitro* and its use to study viral replication. *J Virol.* 1987; 61: 3096–101.
- Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol.* 1989; 63: 3822–8.
- Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, *et al.* rAAV-mediated overexpression of TGF-beta stably restructures human osteoarthritic articular cartilage *in situ*. *J Transl Med.* 2013; 11: 211–24.
- Weimer A, Madry H, Venkatesan JK, *et al.* Benefits of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulin-like growth factor I (IGF-I) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF-I axis. *Mol Med.* 2012; 18: 346–58.
- Jonitz A, Lochner K, Tischer T, *et al.* TGF-beta1 and IGF-1 influence the re-differentiation capacity of human chondrocytes in 3D pellet cultures in relation to different oxygen concentrations. *Int J Mol Med.* 2012; 30: 666–72.
- Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, *et al.* Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 626–36.
- Yang X, Chen L, Xu X, *et al.* TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol.* 2001; 153: 35–46.
- Cucchiari M, Orth P, Madry H. Direct rAAV SOX9 administration for durable articular cartilage repair with delayed terminal differentiation and hypertrophy *in vivo*. *J Mol Med.* 2013; 91: 625–36.

37. **Cucchiari M, Madry H.** Overexpression of human IGF-I via direct rAAV-mediated gene transfer improves the early repair of articular cartilage defects *in vivo*. *Gene Ther.* 2014; 21: 811–9.
38. **Jones EA, Kinsey SE, English A, et al.** Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3349–60.
39. **Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, et al.** The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 3561–73.
40. **Bocker W, Yin Z, Drosse I, et al.** Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1347–59.
41. **Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, et al.** Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17: 1921–33.
42. **Kim HJ, Im GI.** Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011; 20: 2103–14.
43. **Liu TM, Guo XM, Tan HS, et al.** Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum.* 2011; 63: 2711–20.
44. **Haleem-Smith H, Calderon R, Song Y, et al.** Cartilage oligomeric matrix protein enhances matrix assembly during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2012; 113: 1245–52.
45. **Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, et al.** Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R168–80.
46. **Venkatesan JK, Ekici M, Madry H, et al.** SOX9 gene transfer via safe, stable, replication-defective recombinant adeno-associated virus vectors as a novel, powerful tool to enhance the chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3: 22–36.
47. **Neumann AJ, Alini M, Archer CW, et al.** Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells is modulated by complex mechanical stimulation and adenoviral-mediated overexpression of bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A.* 2013; 19: 1285–94.
48. **Cucchiari M, Terwilliger EF, Kohn D, et al.** Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 2476–88.

### Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, mehrere Menschen haben mich sowohl auf menschlicher als auch auf professioneller Ebene in 3 Jahren intensiver Arbeit maßgeblich unterstützt. Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Gerald Thiel** vom *Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie* für seine Betreuung und fachliche Beratung während der Promotionsphase.

Meiner Zweitberichterstatteerin und Betreuerin Frau **Prof. Dr. Magali Madry (geb. Cucchiarini)** vom *Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung* für ihr unermüdliches und intensives Engagement, durch das sie mir jederzeit in thematischen, wissenschaftlichen aber auch menschlichen Belangen zur Seite stand.

Herrn **Prof. Dr. Henning Madry** vom *Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung* sowie Herrn **Prof. Dr. Dieter Kohn** aus der *Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie*, die es mir ermöglicht haben, meine Promotion an diesem Institut durchzuführen. Ihre Mitbetreuung und fundierten Ratschläge zu jeder Zeit trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn **Dr. Lars Goebel** und Herrn **PD Dr. Patrick Orth** der *Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie* für die Organisation der Probenentnahme sowie ihren jederzeit hilfreichen Rat.

Herrn **Dr. Adam Zawada** der Forschungsgruppe der *Inneren Medizin IV* für die Bereitstellung der Geräte und Materialien für FACS Analysen sowie für die unterstützenden persönlichen Ratschläge.

**Ana, Jagi, Gertrud** und **Olli** vom *Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung*, die mir bei allen Fragestellungen und experimentellen Arbeiten stets zur Seite standen und mich freundschaftlich in das Team aufnahmen. 3 Jahre voller wertvoller Diskussionen und produktiver wissenschaftlicher Zusammenarbeit lassen mich auf eine unvergessliche Zeit zurückblicken, aus der wichtige Freundschaften hervorgingen.

Allen anderen **wissenschaftlichen Mitarbeitern** und **Studenten** des *Lehrstuhls für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung* für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie der **Universität des Saarlandes** und dem **Universitätsklinikum des Saarlandes** für die Bereitstellung aller Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Der **Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC)**, der **Graduiertenförderung der Universität des Saarlandes (GradUS)**, dem **Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD)** sowie dem **Knorpelnetz der Großregion** für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung der Arbeit und Präsentation der Ergebnisse auf renommierten nationalen und internationalen Kongressen.

Meinen **Freunden**, die mich unermüdlich auf meinem Weg zur Promotion begleitet haben und durch emotionalen Halt und Motivation aber auch Ablenkung maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank **meiner Familie, vor allem meinen Eltern und Großeltern**, für ihre Geduld, ihren Zuspruch, aber auch die finanzielle Unterstützung. Trotz unerwarteter Hürden verloren sie nie die Kraft, mir mit moralischem Beistand und menschlichem Halt liebevoll zur Seite zu stehen, wofür ich ihnen von ganzem Herzen danken möchte.